

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉVALUATION DE L'INNOCUITÉ ET DE L'EFFICACITÉ D'UN DÉRIVÉ SYNTHÉTIQUE  
MARQUÉ DE L'ADRÉNOMÉDULLINE DANS L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE  
PULMONAIRE CHEZ L'HUMAIN

XAVIER LEVAC

Thèse présentée

À la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal  
Dans le cadre du programme de Doctorat en sciences biomédicales  
Pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)

FACULTÉ DE MÉDECINE

MONTRÉAL

2017

© Xavier Levac, 2017

À mes grands-parents Thérèse et Laurier Levac

Et à ma mère Danielle Levac

« Qui pense peu, se trompe beaucoup »

« Savoir écouter, c'est posséder, outre le sien, le cerveau des autres »

Léonard De Vinci

## Abrégé long

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTP) est une maladie caractérisée par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne au-delà de 25 mmHg au repos. Souvent diagnostiquée à un stade avancé, celle-ci se manifeste d'abord par une dyspnée à l'effort pour évoluer vers une dyspnée au repos. Les personnes atteintes verront progressivement une diminution de leur capacité à mener leurs activités de la vie quotidienne. Il est encore difficile à ce jour de mesurer avec précision de manière non invasive la pression artérielle pulmonaire. Pour ce faire, seul le cathétérisme cardiaque permet d'obtenir une mesure précise.

Dans le but de trouver un meilleur outil diagnostique pour cette affection respiratoire, notre laboratoire a décidé de synthétiser et d'expérimenter un tout nouveau radiotracer prometteur appelé PulmoBind (PB). Celui-ci s'avère être un dérivé synthétique de l'adrénomédulline (AM): un peptide vasodilatateur endogène de 52 acides aminés sécrété par de nombreux organes. Une fois couplé au <sup>99m</sup>Technétium, le PB permet par méthode scintigraphique la visualisation de la circulation pulmonaire métaboliquement active. Cette procédure est possible grâce à la liaison spécifique de ce traceur aux récepteurs de l'AM qui sont exprimés abondamment sur l'endothélium vasculaire pulmonaire, et ce tant au niveau de la macro que de la microcirculation. Lors d'expérimentations *in vivo*, le PB s'est avéré un excellent marqueur de l'hypertension artérielle pulmonaire dans les modèles de rat monocrotaline et hypoxie « Sugen » et s'est avéré également un bon outil de détection pour relever les déficits de perfusion artérielle pulmonaire chez le chien.

La présente recherche a pour but d'étudier la distribution spatiale, l'innocuité ainsi que l'efficacité du PulmoBind dans l'imagerie pulmonaire chez l'humain. Notre étude de phase I (NCT01539889) a été conduite à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Un groupe de 20

participants en bonne santé, âgés entre 20 et 71 ans, a été recruté et assigné à trois groupes distincts à dosages différents soit : 5mCi (n=5), 10 mCi (n=5) et 15 mCi (n=10). Lors de cet essai clinique, la pureté du produit avant injection était supérieure à 95 %. Les images ont démontré une captation pulmonaire prédominante ( $58 \pm 7$  %) et prolongée ( $44 \pm 6$  % après 35 minutes et  $33 \pm 5$  % après 60 minutes) (moyenne  $\pm$  ET). Aucune préoccupation de sécurité n'a été soulevée. Le PB (PulmoBind) a été bien toléré par l'ensemble des participants, et ce sans présence d'effets secondaires graves ou cliniquement significatifs. De plus, les analyses de dosimétrie à la dose la plus élevée de 15mCi ont démontré une quantité de rayonnements ionisants absorbée sécuritaire et en deçà des normes émises par les instances réglementaires. Une étude comparative effectuée par deux nucléistes a permis de comparer les images obtenues avec le PB avec celles normalement acquises par scintigraphie pulmonaire utilisant les macro-agrégats d'albumine (MAA). Cette analyse a démontré dans 60 % des cas une qualité d'image supérieure aux macro-agrégats d'albumine lors d'une lecture à 35 minutes avec une dose de 15 mCi.

D'autre part, nous avons également approfondi notre recherche afin de caractériser la distribution spatiale du PulmoBind dans le but d'évaluer sa capacité à révéler la présence des gradients pulmonaires. De façon significative, les résultats obtenus ont su démontrer l'existence de ceux-ci dans les trois axes soit : dorso-ventral ( $18,1 \pm 2,1$  %), caudo-crânial ( $25,7 \pm 1,6$  %) et médio-latéral ( $7,0 \pm 1,0$  %).

Finalement, dans un futur rapproché, nous espérons que le taux de captation pulmonaire de notre produit ainsi que l'analyse de sa distribution spatiale pouvant servir de marqueur utile pour les cliniciens. Ils pourront alors fournir de l'information pertinente à propos de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, de l'état de la fonction pulmonaire ou bien de la présence de déficits

perfusionnels. À ce jour, aucun produit sur le marché n'emploie des données de captation et de distribution spatiale pour évaluer la circulation respiratoire. Par conséquent, cette nouvelle méthodologie constitue une approche inédite et prometteuse pour le diagnostic de l'HTP et de son suivi.

## Abrégé court

L'HTP est une maladie caractérisée par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne au-delà de 25 mmHg au repos. Dans le but de trouver un meilleur outil diagnostique pour cette affection, notre laboratoire a synthétisé puis expérimenté un radiotracer nommé PulmoBind. Celui-ci s'avère être un dérivé synthétique de l'AM : un peptide vasodilatateur endogène de 52 acides aminés sécrété par de nombreux organes. Une fois couplé au <sup>99m</sup>Technétium, le PulmoBind permet par méthode scintigraphique la visualisation de la circulation pulmonaire métaboliquement active. Suite à notre étude de phase I, le PulmoBind s'est avéré sécuritaire et efficace. De plus, des analyses plus approfondies de la distribution spatiale ont démontré la capacité du PulmoBind à imager les divers gradients de la perfusion pulmonaire. À ce jour, aucun produit sur le marché n'emploie des données de captation et de distribution spatiale pour effectuer l'évaluation de la circulation respiratoire. Par conséquent, cette nouvelle méthodologie constitue une approche inédite et prometteuse pour le diagnostic de l'HTP et de son suivi.

## Mots-clés

Phase I, Adrénomédulline, Médecine nucléaire, Technétium, Peptide, Radiotracer, Imagerie moléculaire, Étude clinique, SPECT, Hypertension artérielle pulmonaire, Circulation pulmonaire, Physiologie circulatoire, Innocuité, Sécurité, Endothélium, Marqueur moléculaire, Physique nucléaire, Imagerie diagnostique, RAMP, Receptor activity modifying protein, Endothélium pulmonaire, Hypertension pulmonaire, HTAP, Calcitonin receptor-like receptor, Dosimétrie

## Abstract

**Background.** The pulmonary circulation is submitted to large physiologic hemodynamic variations and possesses numerous important metabolic functions mediated through its vast endothelial surface. Unfortunately, no test is currently available that can directly evaluate endothelial integrity and pulmonary perfusion gradients at the same time. We developed PulmoBind, a chelated derivative of human adrenomedullin labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  for nuclear medicine SPECT imaging. By specifically binding to its endothelial receptors, abundantly expressed in human alveolar capillaries, PulmoBind can provide a non-invasive evaluation of pulmonary function that can help in the diagnosis of disorders affecting the pulmonary circulation. This thesis represents my doctoral work to determine the safety of PulmoBind in humans and its capacity to generate good quality imaging for diagnosis purposes.

**Methods.** Twenty healthy participants were included into escalating doses groups of 5 mCi (n=5), 10 mCi (n=5) or 15 mCi (n=10)  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind. Vital signs were closely monitored and safety biochemistry and hematology parameters obtained. SPECT imaging was serially performed and  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind dosimetric and spatial distribution analysis accomplished. Imaging quality of the lungs was assessed serially.

**Results.** Radiochemical purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind was greater than 95%. There were no safety concerns at the 3 dosages studied. Imaging revealed a predominant and prolonged lung uptake with mean peak pulmonary extraction of  $58\% \pm 7\%$  (mean  $\pm$  SD) of the injected dose. PulmoBind was well tolerated and resulted in no clinically significant adverse events. The highest dose of 15 mCi provided a favorable dosimetric profile and excellent quality tomographic imaging of the lungs. The postural lung perfusion gradient was detectable. Indeed, dorsal activity was  $18.1 \pm 2.1\%$  greater

than ventral activity, and caudal activity was  $25.7 \pm 1.6\%$  greater than cranial activity. The intensity of PB activity followed a normal distribution while macro aggregated albumin (MAA) activity was importantly skewed and bimodal.

**Conclusion.**  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind up to a dose of 15 mCi is safe and provides good quality lung perfusion imaging that can reveal the heterogeneity of the pulmonary perfusion. Therefore, the safety and efficacy of this agent could be tested in disorders of the pulmonary circulation such as pulmonary arterial hypertension.

## Keywords

Phase I, Adrenomedullin, Nuclear Medicine, Technetium, Peptide, Radiotracer, Molecular Imaging, Clinical Study, SPECT, Pulmonary Arterial Hypertension, Pulmonary Circulation, Safety, Endothelium, Molecular Marker, Nuclear Physics, Diagnostic Imaging, RAMP, Receptor Activity-modifying protein, Pulmonary endothelium, Pulmonary hypertension, PAH, Calcitonin receptor-like receptor, Dosimetry



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur ainsi que mon codirecteur de recherche, Dr Jocelyn Dupuis et Dr François Harel, de m'avoir permis d'effectuer mon doctorat dans un environnement extraordinaire. Je tiens également à souligner l'immense privilège que j'ai eu à travailler dans l'élaboration d'une phase I clinique. Ce type de projet est extrêmement rare dans le milieu académique et par conséquent j'en suis très reconnaissant.

Dans la vie, on rencontre à l'occasion des gens avec qui travailler est un pur plaisir. Ils motivent à chaque matin le lever du lit et rendent les journées dynamiques. Les membres uniques de l'équipe PulmoBind I incluent : Hubert Poiffaut, Sophie Marcil et Vincent Finnerty. Ces personnes ont fait en sorte que les 5 dernières années académiques furent des plus agréables. Nous avons réussi, malgré notre manque d'expérience occasionnel, à mettre sur pieds une étude de phase I qui a su se tirer des éloges à plusieurs reprises par notre monitrice clinique.

Maintenant, Emma et Sophie, je voudrais vous réserver un merci tout particulier puisque vous avez été un soutien indéniable sur le point de vue moral et humain. Nous avons tous eu des hauts et des bas et à chaque fois, nous nous sommes aidés les uns et les autres, pour cela je ne vous oublierai pas de sitôt. Je voudrais également remercier grandement Vincent Finnerty avec qui j'ai passé des heures et des heures à parler de science, de théories et de mathématique. Avec toi je peux dire que j'ai beaucoup appris.

Merci ! Vanessa Hertig : femme de sciences humaines et de ponchos, survivante d'un cancer, vendeuse de lingerie fines, modèle pour peinture de femmes enveloppées, ma seule amie au statut d'étudiant à l'ICM ainsi que ma seule amie carré rouge, triathlonienne dans l'âme, fumeuse, accros

des bazars et vivant en marge de la société. Elle a su m'instruire sur le vintage, la cocotte en bandoulière, le Mile-End, le Mile-Ex et la culture végétarienne avec poulet. Voilà pourquoi je l'adore, elle est tout ce que je ne suis pas.

Je ne peux passer sous silence le support de mes grands-parents et de ma mère tout au long de mes études graduées. Je suis reconnaissant pour l'ensemble de l'aide que vous m'avez apportée sans oublier vos encouragements. Finalement, ceux qui me connaissent bien savent que mes amis occupent une place importante dans ma vie. Vous m'avez permis tout au long de mon doctorat de décrocher et vous m'avez permis de vivre des moments inoubliables. Caro, FloFlo, Goss, Nick, MP, PO, Guillaume, MC et à tous ceux que je ne mentionne pas et que je considère mes amis, merci. Un merci tout particulier à **Dr Dianne Provencher, Hélène Leonard, Caroline Côté** et mon ami de longue date **François Aubé**, pour l'ensemble de leur aide apportée et leurs encouragements lors de la rédaction de cette thèse. Je tiens à souligner François que j'ai maintenant une année universitaire de plus que toi à ce jour, je peux maintenant arrêter...(Check) : p

# Table des matières

<b>ABRÉGÉ LONG</b>	<b>III</b>
<b>ABRÉGÉ COURT</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>IX</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>XI</b>
<b>LISTES DES FIGURES</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX</b>	<b>XVIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>XIX</b>
<b>1 AVANT-PROPOS</b>	<b>2</b>
1.1 ÉTUDE DE CAS	2
1.2 DISCUSSION CLINIQUE	3
1.3 PULMOBIND	4
<b>2 L'APPAREIL RESPIRATOIRE</b>	<b>6</b>
2.1 PHYSIOLOGIE PULMONAIRE	6
2.1.1 GÉNÉRALITÉ	6
2.1.2 ANATOMIE MACROSCOPIQUE	6
2.1.3 LES VOIES AÉRIENNES CONDUCTRICES ET RESPIRATOIRES	6
2.1.4 LES VOLUMES PULMONAIRES	8
2.1.5 LA CIRCULATION PULMONAIRE	10

<b>3</b>	<b>L'HYPERTENSION PULMONAIRE</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>INTRODUCTION À L'HYPERTENSION PULMONAIRE</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>CLASSIFICATION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE</b>	<b>39</b>
3.3.1	L'ENDOTHÉLIUM ET REMODELAGE VASCULAIRE	41
3.3.2	CARACTÉRISTIQUES PATHOPHYSIOLOGIQUES DE L'HTAP	44
3.3.3	LES MODÈLES ANIMAUX DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE	48
<b>3.4</b>	<b>L'ALGORITHME DIAGNOSTIQUE DE L'HTP</b>	<b>52</b>
3.4.2	TOMOGRAPHIE PAR ÉMISSION DE POSITRONS (TEP)	71
<b>3.5</b>	<b>ÉVOLUTION TECHNOLOGIQUE EN MÉDECINE NUCLÉAIRE</b>	<b>73</b>
<b>3.6</b>	<b>NOTIONS THÉORIQUES IMPORTANTES RELIÉES À LA MÉDECINE NUCLÉAIRE</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>LA MÉDECINE NUCLÉAIRE</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>LES RADIONUCLÉIDES</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>LA DÉCROISSANCE RADIOACTIVE</b>	<b>78</b>
4.2.1	RAYONNEMENT A	78
4.2.2	TRANSFORMATION ISOBARIQUE	79
4.2.3	TRANSITIONS PRODUITES PAR L'INTERACTION ÉLECTROMAGNÉTIQUE	80
<b>4.3</b>	<b>LES RADIOPHARMACEUTIQUES</b>	<b>83</b>
4.3.1	LE MARQUAGE	83
4.3.2	LA PURETÉ	83
4.3.3	TEMPS DEMI-VIE EFFECTIF	84
<b>4.4</b>	<b>LE TECHNÉTIUM</b>	<b>85</b>
4.4.1	GÉNÉRATEUR DE TECHNÉTIUM EN CLINIQUE	87
4.4.2	CHAÎNE DE DÉTECTION ET D'ACQUISITION DE L'IMAGE	88

4.4.3	LA DOSIMÉTRIE	99
<b>5</b>	<b>L'ADRÉNOMÉDULLINE</b>	<b>104</b>
<b>5.1</b>	<b>FACTEUR H (FH)</b>	<b>105</b>
<b>5.2</b>	<b>SYNTHÈSE DE L'AM</b>	<b>106</b>
5.2.1	SÉCRÉTION DE L'ADRÉNOMÉDULLINE (AM)	107
<b>5.3</b>	<b>L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE L'ADRÉNOMÉDULLINE (AM)</b>	<b>110</b>
<b>5.4</b>	<b>RELATION STRUCTURE ET ACTIVITÉ</b>	<b>112</b>
<b>5.5</b>	<b>LES RÉCEPTEURS À L'ADRÉNOMÉDULLINE</b>	<b>116</b>
5.5.1	LE CLR	116
5.5.2	LES RAMPS	117
5.5.3	RÉGULATION DE L'EXPRESSION	119
<b>6</b>	<b>LE PULMOBIND ET LES DONNÉES PRÉCLINIQUES</b>	<b>121</b>
<b>6.1</b>	<b>PULMOBIND ET LA PURETÉ</b>	<b>121</b>
<b>6.2</b>	<b>LES ÉTUDES D'AFFINITÉ AVEC LE RÉCEPTEUR DE L'AM</b>	<b>121</b>
<b>6.3</b>	<b>LES ÉTUDES DE BIODISTRIBUTION CHEZ L'ANIMAL</b>	<b>122</b>
<b>6.4</b>	<b>ÉVALUATION DE LA DOSIMÉTRIE CHEZ L'ANIMAL</b>	<b>123</b>
<b>6.5</b>	<b>ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ HÉMODYNAMIQUE CHEZ L'ANIMAL</b>	<b>123</b>
<b>6.6</b>	<b>LES TESTS PRÉCLINIQUES SUPPLÉMENTAIRES</b>	<b>124</b>
<b>6.7</b>	<b>L'EFFICACITÉ</b>	<b>124</b>
<b>6.8</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>125</b>

<b>7</b>	<b><u>HYPOTHÈSE DE L'ÉTUDE</u></b>	<b>127</b>
<b>7.1</b>	<b>OBJECTIFS DE L'ÉTUDE :</b>	<b>127</b>
7.1.1	ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ	127
7.1.2	EFFICACITÉ	127
7.1.3	DÉTERMINATION DE LA DOSE OPTIMALE	128
<b>8</b>	<b><u>ARTICLE 1 SAFETY OF PULMOBIND FOR MOLECULAR IMAGING OF THE HUMAN PULMONARY CIRCULATION</u></b>	<b>130</b>
<b>8.1</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>131</b>
<b>8.2</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>132</b>
<b>8.3</b>	<b>METHODS</b>	<b>133</b>
<b>8.4</b>	<b>RESULTS</b>	<b>137</b>
<b>8.5</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>140</b>
<b>8.6</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>143</b>
<b>8.7</b>	<b>SUPPLEMENTAL DATA</b>	<b>155</b>
<b>8.8</b>	<b>STUDY PROTOCOL</b>	<b>159</b>
<b>9</b>	<b><u>ARTICLE 2 EVALUATION OF PULMONARY PERFUSION USING AN ENDOTHELIAL CELL TRACER IN SUPINE HUMANS AND DOGS</u></b>	<b>161</b>
<b>9.1</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>162</b>
<b>9.2</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>165</b>
<b>9.3</b>	<b>METHODS</b>	<b>167</b>
<b>9.4</b>	<b>RESULTS</b>	<b>171</b>
<b>9.5</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>173</b>
<b>9.6</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>177</b>

<b>10 DISCUSSION</b>	<b>190</b>
<b>10.1 FACTEURS POUVANT INFLUENCER LA CAPTATION PULMONAIRE DU PB</b>	<b>209</b>
10.1.1 RÉCEPTEURS	209
10.1.2 LE TAUX D'ADRÉNOMÉDULLINE CIRCULANT	210
10.1.3 LE FACTEUR H (FH)	210
10.1.4 LE DÉBIT CIRCULATOIRE ET LA PRESSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE	211
10.1.5 TAUX DE MARQUAGE	212
10.1.6 MODE DE DÉTECTION	212
10.1.7 LE VIEILLISSEMENT, LE GENRE ET L'OBÉSITÉ	214
10.1.8 L'ÉTIOLOGIE DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE	215
<b>10.2 PERSPECTIVES</b>	<b>216</b>
10.2.1 TEP-SCAN	216
10.2.2 ADMINISTRATION DU PB DANS DIVERSES CONDITIONS PATHOLOGIQUES	216
10.2.3 TEST À L'EFFORT	217
10.2.4 TEST LORS D'UN CHANGEMENT POSITIONNEL	218
10.2.5 TEST DE VENTILATION/PERFUSION	219
10.2.6 LE DIAGNOSTIC DE L'EMBOLIE PULMONAIRE	219
<b>CONCLUSION</b>	<b>222</b>

## Liste des figures

FIGURE 1. L'ANATOMIE PULMONAIRE ET SES PRINCIPALES STRUCTURES .....	7
FIGURE 2. SCHÉMATISATION DE LA VARIATION DES VOLUMES PULMONAIRES.....	10
FIGURE 3. PHYSIOLOGIE PULMONAIRE .....	12
FIGURE 4. STRUCTURE D'UN VAISSEAU .....	14
FIGURE 5. DISTENSION ET RECRUTEMENT VASCULAIRE.....	17
FIGURE 6. DENSITÉ TISSULAIRE ET LE « SLINKY EFFECT » .....	18
FIGURE 7. MODÈLE DE WEST ET HUGHES .....	20
FIGURE 8. L'IMPACT DES VOLUMES PULMONAIRES SUR LA PERFUSION PULMONAIRE.....	23
FIGURE 9. INFLUENCE DE LA POSTURE SUR LA CAPACITÉ RÉSIDUELLE FONCTIONNELLE.....	24
FIGURE 10. EFFET DE LA POSTURE SUR LA DYNAMIQUE INTERNE.....	25
FIGURE 11. EFFET DE L'OBÉSITÉ SUR LES VOLUMES RESPIRATOIRES .....	26
FIGURE 12. FONCTION BIOLOGIQUE DE L'ENDOTHÉLIUM ET DE LA COUCHE MUSCULAIRE LISSE .....	34
FIGURE 13. PATHOGENÈSE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE.....	43
FIGURE 14. ARTÉRIOPATHIE DANS L'HTAP .....	46
FIGURE 15. COMPARAISON DE DEUX IMAGES PANCORPORELLES D'UN RAT CONTRÔLE ET D'UN RAT MONOCROTALINE 30 MINUTES APRÈS INJECTION DU PB .....	49
FIGURE 16. CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX D'HTP À LA CLASSIFICATION DE L'HTP HUMAINE. IMAGE REDESSINÉE, MODIFIÉE ET INSPIRÉE DE DUPUIS ET AL. ....	51
FIGURE 17. CAPTATION PULMONAIRE DU PULMOBIND DANS UN MODÈLE D'HTAP HYPOXIE/SUGEN .....	52
FIGURE 19. ILLUSTRATION DES DIFFÉRENTS TYPES D'ÉMISSION PARTICIPANT À LA DÉCROISSANCE RADIOACTIVE .....	82
FIGURE 20. SCHÉMATISATION DE LA DÉSINTÉGRATION DU <sup>99</sup> MO.....	87
FIGURE 21. REPRÉSENTATION DES DIVERS COLLIMATEURS DISPONIBLE EN TEMP POUR L'ACQUISITION D'IMAGES.....	90
FIGURE 22. EFFET DU VOLUME PARTIEL.....	96
FIGURE 23. PRINCIPE DE DÉTECTION D'UNE CAMÉRA GAMMA ET LES BIAIS QUANTITATIFS POSSIBLES QUI S'Y RATTACHENT.....	98
FIGURE 25. STRUCTURE DE L'ADRÉNOMÉDULLINE.....	107
FIGURE 26. FACTEURS STIMULANT ET INHIBANT LA PRODUCTION DE L'AM.....	109
FIGURE 27. COMPARAISON DES STRUCTURES DE L'ADRÉNOMÉDULLINE ET DU PULMOBIND .....	113



FIGURE 28. ILLUSTRATION DES RÉCEPTEURS DE LA FAMILLE DE LA CALCITONINE .....	118
FIGURE 29. DÉFICIT PERFUSIONNEL VISUALISÉ DANS LES PLANS CORONALE, SAGGITALE ET TRANSVERSE SUITE À L'INJECTION DU PB CHEZ UN CHIEN AYANT SUBI UNE LIGATURE VASCULAIRE AU NIVEAU PULMONAIRE .....	124
FIGURE 30. ÉNUMÉRATION DES CONDITIONS ESSENTIELLES POUR DÉVELOPPER UN RADIOPHARMACEUTIQUE PROMETTEUR .....	193
FIGURE 31. GRAPHIQUES DE LA FRÉQUENCE CARDIAQUE (A) ET DE LA VARIATION DES TENSIONS ARTÉRIELLES SYSTOLIQUES (B) ET DIASTOLIQUE (B) EN FONCTION DU TEMPS SUITE À L'ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE DU PB.....	198
FIGURE 32. GRAPHIQUE DE L'ACTIVITÉ MOYENNE EN FONCTION DU CUMULATIF DE VOXELS POUR LES POUMONS DROIT ET GAUCHE EN FONCTION DE DIFFÉRENTS DOSAGES DU PB.....	206
FIGURE 33. ILLUSTRATION DE LA FRÉQUENCE DE DISTRIBUTION DU <sup>99m</sup> Tc PULMOBIND CHEZ L'HUMAIN .....	208
FIGURE 34. EFFET HYPOTHÉTIQUE DES VARIATIONS HÉMODYNAMIQUES SUR LA CAPTATION DU PB .....	212
FIGURE 35. ILLUSTRATION DE LA PAPM EN FONCTION DE LA PERTE DU LIT CAPILLAIRE ET DE L'EFFORT DANS L'HTP.....	218

## Listes des tableaux

TABLEAU 1. CARACTÉRISTIQUES FONCTIONNELLES ET TISSULAIRES DU VIEILLISSEMENT PULMONAIRE. TABLEAU TIRÉ DE H. GUÉNARD [23].....	27
TABLEAU 2. CLASSIFICATION DE L'HTP ÉTABLIE LORS DU CINQUIÈME WORLD SYMPOSIUM ON PH, NICE 2013 [42, 44].....	38
TABLEAU 3. CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DE LA DYSPNÉE DE LA NYHA MODIFIÉE PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ D'APRÈS S. RICH. PRIMARY PULMONARY, EVIAN : WHO 1998 [47].....	40
TABLEAU 4. CORRÉLATION ENTRE LA CLASSIFICATION DE L'HTP ET LES DIVERSES CARACTÉRISTIQUES DU REMODELAGE VASCULAIRE. TABLEAU DESSINÉ ET INSPIRÉE DE DICKINSON, WAGENVOORT ET MOOI [56, 57].....	47
TABLEAU 5. TABLEAU DE LA SENSIBILITÉ ET LA SPÉCIFICITÉ DE L'ÉCHOGRAPHIE TRANSTHORACIQUE DANS LE DIAGNOSTIQUE DE L'HYPERTENSION PULMOAIRE LORS DE L'ÉTUDE DE GREINER ET AL.....	57
TABLEAU 6. TABLEAU DES DIVERSES ANALYSES ET BILANS SANGUINS POUVANT ÊTRE EFFECTUÉS DANS L'OPTIQUE DE DÉTERMINER L'ÉTIOLOGIE DE LA MALADIE. TABLEAU REDESSINÉ, MODIFIÉ ET INSPIRÉ DE [65, 80].....	61
TABLEAU 7. PRINCIPAUX ISOTOPES UTILISÉS EN TEP, LEUR DEMI-VIE ET LEUR MODE DE PRODUCTION. TABLEAU REDESSINÉ, MODIFIÉ ET INSPIRÉ DE [89].....	72
TABLEAU 8. RÉSUMÉS DES RADIOTRACEURS EXPÉRIMENTAUX UTILISÉS EN TEP ET EN TEMP POUR L'IMAGERIE DE LA PERFUSION PULMONAIRE.....	74
TABLEAU 9. TABLEAU COMPARATIF DES AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES DIVERSES TECHNIQUES D'IMAGERIE DE LA PERFUSION. TABLEAU REDESSINÉ, MODIFIÉ ET INSPIRÉ DE [97].....	76
TABLEAU 10. TABLEAU ÉNUMÉRANT LES FACTEURS DE PONDÉRATION DES DIFFÉRENTS RAYONNEMENTS.....	100
TABLEAU 11. TABLEAU DES FACTEURS DE PONDÉRATION TISSULAIRE UTILISÉS LORS D'ÉTUDE DE DOSIMÉTRIE. TIRÉ DE [107].....	101
TABLEAU 12. TABLEAU DES DOSES DE RADIOACTIVITÉ MAXIMALES ADMISSIBLES SUR UNE BASE ANNUELLE ET POUR UNE SIMPLE DOSE. TIRÉ DE [110].....	102
TABLEAU 13. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE L'ADRÉNOMÉDULLINE. TABLEAU INSPIRÉ DE [123, 143-157].....	111
TABLEAU 14. TABLEAU DES DIFFÉRENTS ANALOGUES DE L'ADRÉNOMÉDULLINE ET LEURS ACTIVITÉS BIOLOGIQUES. TABLEAU DESSINÉ ET INSPIRÉ DE [159-162].....	115
TABLEAU 15. TABLEAU DES DIVERS RÉCEPTEURS DE LA FAMILLE DE LA CALCITONINE ET LEURS LIGANDS ASSOCIÉS.....	119
TABLEAU 16. TABLEAU COMPARATIF ENTRE LES AGENTS D'IMAGERIE MAAS ET PULMOBIND.....	202
TABLEAU 17. PERSPECTIVE DES ÉTUDES CLINIQUES À VENIR DANS LE BUT DE MIEUX CARACTÉRISER LA CAPTATION PULMONAIRE DU PB.....	217

## Liste des abréviations

<b>5-HT</b>	Sérotonine
<b>5-LO</b>	Arachidonate 5-lipoxygénase
<b>AC</b>	Adénylyl cyclase
<b>ACE</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>Ach</b>	Acétylcholine
<b>ACE</b>	Angiotensin converting enzyme Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>AI</b>	Angiotensine I
<b>AI</b>	Angiotensin II
<b>AM</b>	Adrénomédulline
<b>AM1</b>	Récepteur adrénomédulline (RAMP2/CLR)
<b>AM2</b>	Récepteur adrénomédulline (RAMP3/CLR) Adrénomédulline 2
<b>AMBP-1</b>	Adrenomedulin binding proteine 1 Protéine de liaison de l'adrenomedullin 1 (facteur H)
<b>AMPc</b>	Adenosine monophosphate cyclase
<b>AMY</b>	Amyline
<b>AP-P</b>	Aminopeptidase P
<b>APJ</b>	Récepteur à l'apeline
<b>ASL</b>	Arterial spin labelling Imagerie de perfusion par marquage de spins
<b>AT1</b>	Récepteur à l'angiotensine 1
<b>ATCD</b>	Antécédents
<b>AUC</b>	Area under the curve Aire sous la courbe
<b>BK</b>	Bradykinine
<b>BKca</b>	Calcium-activated big potassium channels Canaux potassiques calcium dépendant
<b>Bmax</b>	Bind maximum Quantité de produit maximum sous sa forme liée
<b>BNP</b>	Peptide natriurique cérébral
<b>cAMP</b>	Adenosine 3,5-monophosphate cyclique

<b>cGMP</b>	Cyclic guanosine monophosphate Guanosine monophosphate cyclique
<b>CE</b>	Cellule endothéliale
<b>CF</b>	Capacité de fermeture
<b>CFR</b>	Capacité fonctionnelle résiduelle
<b>CGRP</b>	Calcitonin gene-related peptide Peptide relié au gène calcitonine
<b>CLR</b>	Récepteur apparenté à la calcitonine
<b>CLR</b>	Récepteur apparenté au récepteur de la calcitonine
<b>Cmax</b>	Concentration maximale
<b>CML</b>	Cellules musculaires lisses
<b>CO2</b>	Dioxyde de carbone
<b>COX</b>	Cyclo-oxygénase
<b>CP</b>	Captation pulmonaire
<b>CPT</b>	Capacité pulmonaire totale
<b>CRLR</b>	Récepteur apparenté au récepteur de la calcitonine
<b>CRF</b>	Case report form Cahier d'observations
<b>CRP</b>	C-reactive protein Protéine C réactive
<b>CT</b>	Computed tomography Tomographie assistée par ordinateur
<b>CT</b>	Calcitonine
<b>CTR</b>	Calcitonin receptor Récepteur de la calcitonine
<b>CTA</b>	Clinical trial application Demande d'essai clinique
<b>CV</b>	Capacité vitale
<b>CVF</b>	Capacité viatale forcée
<b>D</b>	Récepteur dopaminergique
<b>DC</b>	Débit Cardiaque
<b>DEM</b>	Débit expiratoire maximal

<b>DEP</b>	Débit expiratoire de pointe
<b>DLCO</b>	Diffusing capacity for carbon monoxide Capacité pulmonaire de diffusion du monoxyde de carbone
<b>DRS</b>	Douleur rétrosternale
<b>DV</b>	Dorso-ventral
<b>EC</b>	Cellule endothéliale
<b>ECE</b>	Enzyme de conversion de l'endothéline
<b>ECG</b>	Électrocardiogramme
<b>EDHF</b>	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
<b>EET</b>	Epoxyeicosatrienoic acids Acide epoxyeicosatrienoic
<b>EFR</b>	Épreuve Fonctionnelle Respiratoire
<b>eNOS-3</b>	Endothelial nitric oxide synthase Oxyde nitrique synthase endothélial
<b>ERb</b>	Estrogen receptor Récepteur à l'estrogène b
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>ETA</b>	Récepteur de l'endothéline A
<b>ETB</b>	Récepteur de l'endothéline B
<b>ETT</b>	Echographie transthoracique
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FEF</b>	Forced expiratory flow Débit respiratoire forcé
<b>FEV1</b>	Volume expiratoire maximal en 1 seconde
<b>FH</b>	Facteur H
<b>FIO2</b>	Fraction d'oxygène inspiré
<b>FVC</b>	Forced vital capacity Capacité vitale forcée
<b>GMP</b>	Guanosine monophosphate
<b>GMPc</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate

<b>H1</b>	Récepteur histamique 1
<b>HPTEC</b>	Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique
<b>HTA</b>	Hypertension artérielle
<b>HTAP</b>	Hypertension artérielle pulmonaire
<b>HTP</b>	Hypertension pulmonaire
<b>I</b>	Iode
<b>IC</b>	Insuffisance cardiaque
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>ICM</b>	Institut de Cardiologie de Montréal
<b>IL-1</b>	Interleukine 1
<b>IL-2</b>	Interleukine 2
<b>IMD</b>	Intermédiaire
<b>INF-Y</b>	Interferon gamma
<b>IP</b>	Insuffisance pulmonaire
<b>IR</b>	Insuffisance rénale
<b>IRM</b>	Image par résonance magnétique
<b>IT</b>	Insuffisance tricuspidiennne
<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>keV</b>	Kilo électron volt
<b>L-Arg</b>	L-arginine
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LSD</b>	Lung scan dose - dose pulmonaire de scan
<b>M</b>	Récepteur muscarinique
<b>MAA</b>	Microaggregated albumin Macroagrégats d'albumine
<b>mG</b>	Microgravité
<b>ML</b>	Médio-latéral
<b>mmHg</b>	Milimètre de mercure

<b>MMP-2</b>	Matrix metalloproteinase-2 Métalloprotéinase matricielle-2
<b>MO</b>	Molybdène
<b>MPOC</b>	Maladie pulmonaire obstructive chronique
<b>MRproAM</b>	Mid-region proadrenomedullin
<b>NE</b>	Norépinephrine
<b>NATcO<sub>4</sub></b>	Sodium pertechnetate
<b>NET</b>	Norepinephrine transporter Transporteur à la norépinephrine
<b>NK-1</b>	Neurokinin receptor Récepteur à la neurokinine
<b>NO</b>	Oxyde nitrique
<b>NOL</b>	Non Objection Letter - lettre de non objection
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>OD</b>	Oreillette droite
<b>OR</b>	Opioid receptor Récepteur opioïde
<b>Pa</b>	Pression alvéolaire pulmonaire
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Pression alvéolaire du dioxyde de carbone
<b>PAF</b>	Platelet activating factor - facteur d'activation plaquettaire
<b>PAO<sub>2</sub></b>	Pression partielle de l'oxygène artérielle
<b>PAP</b>	Pression artérielle pulmonaire
<b>PAPd</b>	Pression artérielle pulmonaire diastolique
<b>PAPm</b>	Pression artérielle pulmonaire moyenne
<b>PAPs</b>	Pression artérielle pulmonaire systolique
<b>PB</b>	PulmoBind
<b>Pb</b>	Pression barométrique
<b>PCP</b>	Pression capillaire pulmonaire
<b>PDE5</b>	Phosphodiesterase-5
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes

<b>PEF</b>	Débit expiratoire de pointe
<b>PEP</b>	Pression respiratoire positive
<b>PGH2</b>	Prostaglandine H2
<b>PGI2</b>	Prostaglandine I2
<b>Pisf</b>	Pression interstitielle pulmonaire
<b>PKG</b>	Phosphokinase G
<b>PLA2</b>	Phospholipase A2
<b>POD</b>	Pression de l'oreillette droit
<b>PVP</b>	Pression veineuse pulmonaire
<b>RAMP</b>	Protéine modifiant l'activité du récepteur
<b>ROS</b>	Dérivé réactif de l'oxygène
<b>RVP</b>	Résistance Vasculaire Pulmonaire
<b>S1</b>	Récepteur sérotoninergique
<b>SCA</b>	Syndrome coronarien aigu
<b>SP</b>	Substance P
<b>T3</b>	Triiodothyronine
<b>TAPSE</b>	Tricuspid annular plane systolic excursion
<b>Tc</b>	Technétium
<b>TDM</b>	Tomodensitométrie
<b>Tei</b>	Indice de la fonction systolo-diastolique
<b>TEI/RIMP</b>	Indexe de la performance myocardique droite
<b>TEMP</b>	Tomographie d'émission monophotonique
<b>TEP</b>	Tomodensitométrie par émission de positron
<b>TGF</b>	Facteur de croissance tumoral
<b>TH</b>	Récepteur à la thromboxane
<b>Thr</b>	Thrombine
<b>TIE</b>	Tomographie d'impédance électrique



<b>TLR</b>	Récepteur de type Toll
<b>Tmax</b>	Temps maximal
<b>TNF</b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>TVO</b>	Trouble ventilatoire obstructif
<b>TVR</b>	Trouble venttilatoire restrictif
<b>TXA2</b>	Thromboxane A2
<b>VC</b>	Vital capacity
<b>VC</b>	Volume courant
<b>VD</b>	Ventricule droit
<b>VEGF</b>	Facteur de croissance endothéliale vasculaire
<b>VEMS</b>	Volume expiratoire maximum en 1 seconde
<b>VF</b>	Volume de fermeture
<b>VG</b>	Ventricule gauche
<b>VIP</b>	Peptide intestinal vasoactif
<b>VPAC</b>	Récepteur du peptide intestinal vasoactif
<b>VR</b>	Volume résiduel
<b>VRE</b>	Volume de réserve expiratoire
<b>VRI</b>	Volume de réserve inspiratoire

# Chapitre 1

## Avant-Propos

### 1.1 Étude de cas

Voici la présentation d'une histoire de cas pouvant faire l'objet d'une consultation aux urgences. Madame Thibault, âgée de 45 ans, réside dans les Laurentides depuis plus de 20 ans. Enseignante de profession et sédentaire, elle possède des antécédents (ATCD) d'asthme juvénile et de rhinite allergique, mais aucun antécédent familial particulier. Elle accuse depuis plus de deux ans une fatigue, une prise de poids, une légère dyspnée progressive à l'effort et une toux sèche parfois persistante. Elle se présente aujourd'hui à l'urgence pour l'ensemble de ses symptômes et pour une douleur rétrosternale (DRS) de quelques minutes résolue.

Lors de l'examen physique, rien de particulier n'est à signaler. De plus les tests de fonction respiratoire, la radiographie pulmonaire et l'électrocardiogramme (ECG) au repos sont sans particularité. Les examens sanguins confirment des troponines, des D-dimères et un gaz veineux normaux et une absence d'état infectieux. Toutefois, on observe une légère anémie microcytaire ferriprive. L'urgentologue demande une échocardiographie transthoracique (ETT) et une consultation en cardiologie. La conclusion du rapport de l'ETT ne révèle aucune anomalie et le cardiologue de garde à l'urgence donne congé à la patiente avec un dispositif portable qui permet l'enregistrement en continu de l'activité électrique du cœur (Holter™) en externe.

**Plan :** Observation 24 heures à l'urgence sur moniteur, départ au matin avec prescription d'un supplément de fer, un Holter™ en externe et une relance en cardio et au CLSC.

## 1.2 Discussion clinique

L'investigation plus approfondie d'une dyspnée légère à l'effort inexplicée fait rarement l'objet d'une priorité aux urgences. La DRS dirigera plus probablement le clinicien vers un diagnostic différentiel cardiaque et non pulmonaire. De plus, il est bien de mentionner qu'à l'ETT, la valeur de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) n'avait pas été calculée en raison de l'absence d'une régurgitation tricuspidiennne. Malheureusement, les urgentologues et les médecins de famille ne lisent que très peu les détails lors d'un rapport d'échographie et se limitent très souvent qu'à la conclusion. Par conséquent, la PAP est fréquemment une donnée laissée pour contre d'autant plus que la raison de l'examen, dans ce cas, était pour une histoire de DRS. Par conséquent, la dyspnée sera probablement mise sur la faute de l'anémie si petite soit-elle (hémoglobine : 100 g/L), son poids, la ménopause et la sédentarité de madame Thibault. Toutefois, quelques années plus tard elle recevra le diagnostic d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) à un stade classe NYHA III. À l'urgence, le médecin n'avait pas inclus dans son diagnostic différentiel : (*HTAP groupe I*).

Un élément important à ne pas oublier est que le diagnostic de l'HTAP doit être soupçonné à tout moment en présence de symptômes compatibles (même légers). La problématique est que la présentation clinique de la maladie est non spécifique. Par conséquent, l'examen physique est peu contributif et une radiographie pulmonaire, un ECG, des analyses sanguines, ou des tests de fonction respiratoire normaux n'excluent en rien une HTAP. Ce n'est qu'à la suite d'une accumulation d'évidences que le diagnostic est posé, et ce généralement à un stade avancé de la maladie. Il devient important de développer de nouvelles stratégies afin de favoriser un diagnostic précoce et par le fait même d'améliorer le pronostic des patients.

SOLUTION PULMOBIND

### **1.3 PulmoBind**

Ce nouveau radiotraceur pulmonaire a été pensé, synthétisé et expérimenté au sein de notre laboratoire à l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM). Il a été conçu dans le but de diagnostiquer de façon précoce les affections touchant la circulation ainsi que la fonction métabolique pulmonaire. Dans l'intention de bien comprendre son usage et son potentiel clinique, il est important de bien saisir la physiologie pulmonaire, le phénomène de l'HTP et l'imagerie nucléaire qui seront discutés en introduction.

# Chapitre 2

# L'appareil respiratoire

## 2.1 Physiologie pulmonaire

### 2.1.1 Généralité

Le système respiratoire est un appareil complexe et essentiel à la survie humaine. Outre sa fonction principale d'échangeur de gaz, ce système joue un rôle clef dans la phonation, dans les mécanismes de défense, l'équilibre acido-basique et le métabolisme [1, 3, 4].

### 2.1.2 Anatomie macroscopique

L'appareil respiratoire est constitué de voies aériennes, de deux poumons possédant chacun leurs propres artères et veines, d'un système nerveux responsable du contrôle de la respiration ainsi que d'une cage thoracique (le diaphragme, les muscles intercostaux et les côtes) (voir figure 1A). La morphologie des deux poumons diffère en raison de la position du cœur qui est latéralisé vers la gauche. Par conséquent, le poumon droit est constitué de trois lobes comparativement à celui de gauche qui n'en possède que deux. Pour diminuer les frottements occasionnés par le mouvement respiratoire, les poumons sont entourés d'une double membrane (plèvre viscérale et la plèvre pariétale) formant un espace intra pleural dans lequel on retrouve le liquide pleural. Celle-ci joue un rôle important dans le maintien des structures pulmonaires en appliquant une pression négative inférieure d'au moins 4mmHg (4-8mmHg) en comparaison avec la pression intra alvéolaire [3, 5].

### 2.1.3 Les voies aériennes conductrices et respiratoires

Précédée par la bouche, le nez, le pharynx et le larynx, la trachée est la première structure de l'arbre bronchique qui permet de relier le larynx aux bronches. Pour leur part, les cils vibratiles et les cellules à mucus présents au niveau épithélial jouent un rôle important dans la protection de

l'organisme contre les particules exogènes. La trachée se subdivise au niveau de l'angle sternal en deux bronches souches asymétriques qui se subdivisent à leur tour à plusieurs reprises pour finalement former les alvéoles pulmonaires. Le rôle et la structure des voies aériennes diffèrent beaucoup en fonction des 23 générations de l'arbre respiratoire tels qu'illustrés à la figure 1B.

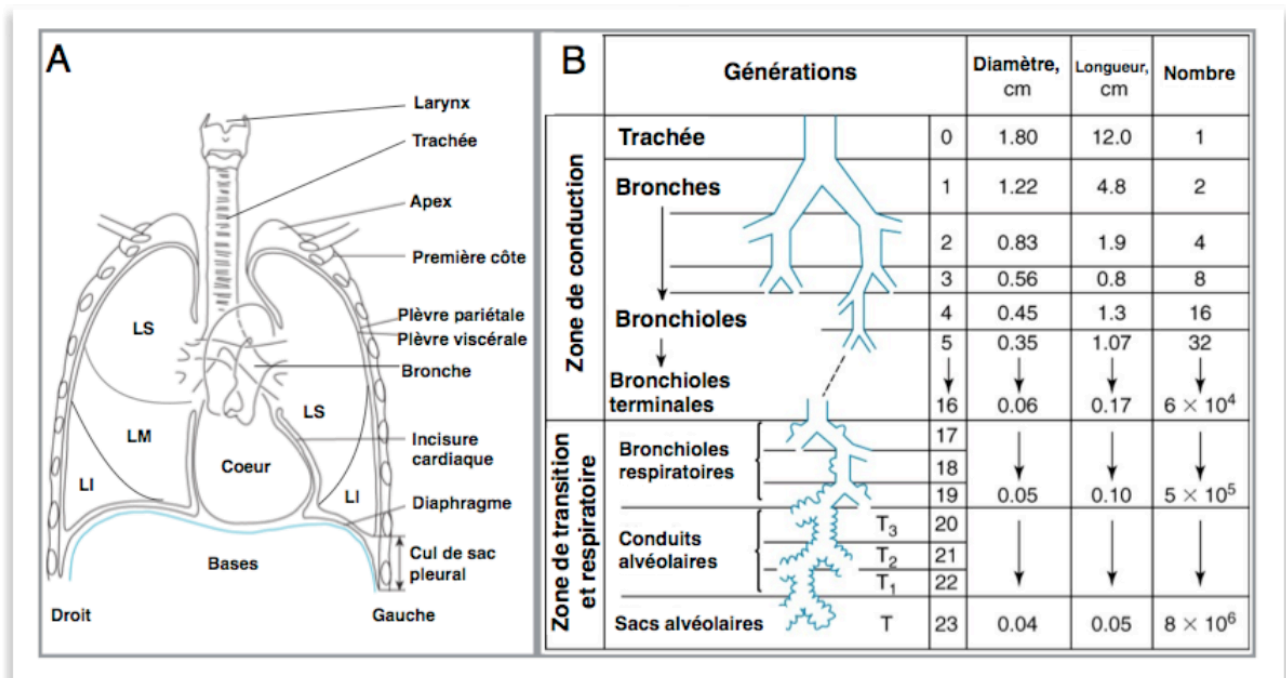


Figure 1. L'anatomie pulmonaire et ses principales structures

L'anatomie pulmonaire et ses principales structures (A). Représentation schématique des voies aériennes et de ses embranchements ainsi que de ses dimensions approximatives (B). (Lobe supérieur (LS), lobe moyen (LM) et lobe inférieur (LI)) Image modifiée de Levitzky 2013 [1]. Reproduction autorisée.

Les premières 16 générations forment une zone de conduction sans échange gazeux créant ainsi ce qu'on appelle le volume mort. Les générations subséquentes 17 à 19 constituent quant à elles une région de transition mixte dans laquelle les alvéoles font leur apparition. Les dernières générations, 20 à 23, composent la zone respiratoire et le lieu principal des échanges gazeux grâce à la présence en abondance des alvéoles. Aussi petites que 250 microns en diamètre, ces alvéoles, au



compte de 3 à 6 x10<sup>8</sup> unités regroupés en grappe, constituent la majorité du tissu pulmonaire et permettent une surface impressionnante d'échange supérieure à 130 m<sup>2</sup> et ce, pour un volume inférieur à 3L [1]. Pour favoriser la diffusion et les échanges gazeux, les alvéoles sont recouvertes de 80 à 90 % de capillaires. Par conséquent, le système respiratoire comptera environ 280 milliards de capillaires, soit 500 à 1000 capillaires par alvéole [1].

#### **2.1.4 Les volumes pulmonaires**

La respiration est un processus actif et passif rendu possible grâce à la variation des pressions internes de la cavité thoracique. Lors de l'inspiration, en fonction de la compliance pulmonaire, le diaphragme et les muscles intercostaux se contractent et provoquent une diminution de la pression pulmonaire interne. Cette diminution permettra de faciliter le passage de l'air du pharynx aux poumons. Lors de l'expiration, la réduction des volumes est dite passive puisqu'elle ne requiert aucun effort musculaire et dépendra des propriétés élastiques du poumon et du surfactant présent. Néanmoins, l'expiration forcée est un processus actif qui implique la diminution du volume de la cage thoracique par la contraction des muscles abdominaux.

Durant une respiration normale, le volume d'air échangé que l'on nomme volume courant (VC) est d'environ 500 ml. Lors d'une inspiration profonde, le supplément d'air pouvant pénétrer se nomme le volume de réserve inspiratoire (VRI) (2100-3200 ml). Le volume de réserve expiratoire (VRE) est le volume qu'il est possible d'expirer d'une façon active lors d'une respiration normale en addition au volume courant (1200 ml). Le volume qu'il est impossible d'expulser à la fin d'une expiration forcée est appelé volume résiduel (VR) (1200 ml). Celui-ci permet de maintenir un volume essentiel dans le but d'éviter l'affaissement des alvéoles pulmonaires. La capacité vitale (CV) est la quantité d'air maximale qui peut être échangé, soit

environ 4800 ml chez un homme en bonne santé. En additionnant le VR à ce volume, nous obtenons la capacité pulmonaire totale (CPT) estimée à 6000 ml. La capacité fonctionnelle résiduelle (CFR) est la quantité d'air restant dans le poumon après une expiration normale et se définit comme la somme du VR et du VRE (3000 ml) [1, 6].

À bas volume pulmonaire, la pression pleurale est positive particulièrement aux bases pulmonaires alors qu'elle est normalement négative. Ce phénomène a pour effet d'entraîner la fermeture des voies aériennes périphériques. Le niveau de volume en dessous duquel il y a un début de fermeture se définit comme le volume de fermeture (VF) qui se situe en moyenne entre 10 et 20 % de la capacité vitale chez l'humain de 30 à 40 ans [1]. Lorsque le niveau de fermeture dépasse le volume courant par une diminution de la CFR (obésité, décubitus dorsal ou l'anesthésie générale), l'inspiration normale ne permet pas d'atteindre un volume suffisant pour l'ouverture des voies respiratoires entraînant l'apparition d'une atelectasie. La capacité de fermeture (CF) est la somme du VR et du VF. La valeur des différents volumes est schématisée à figure 2.

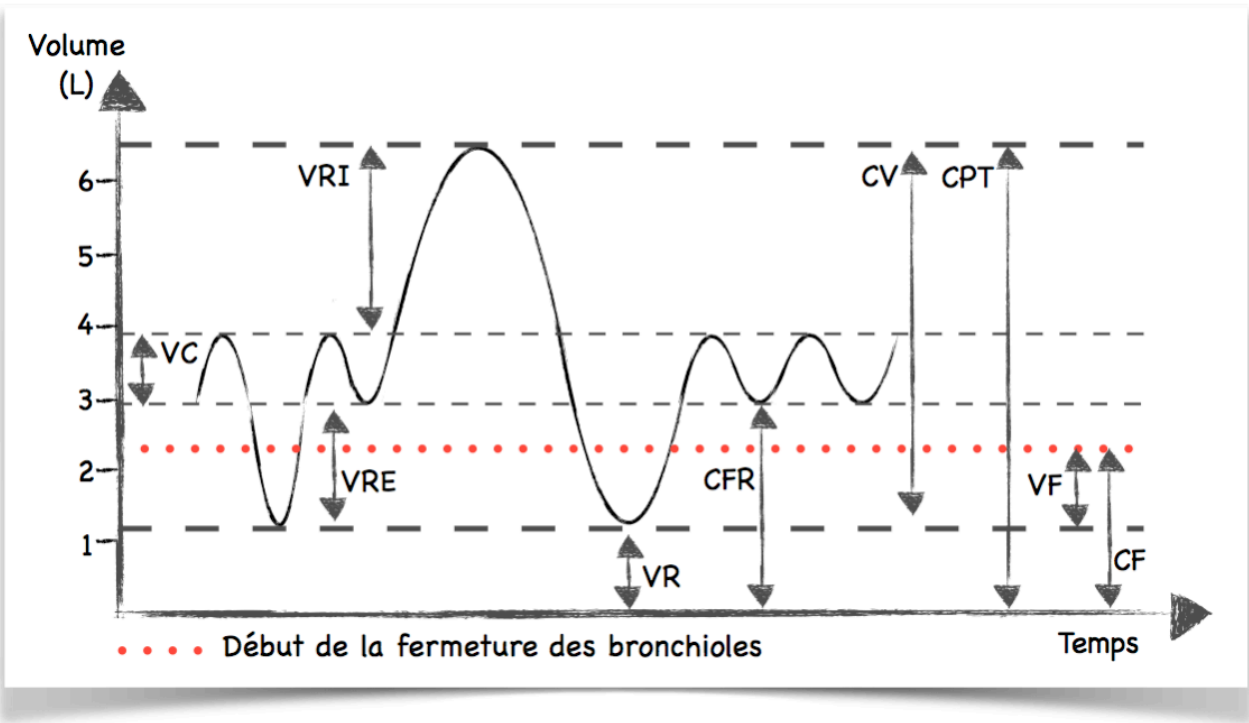


Figure 2. Schématisation de la variation des volumes pulmonaires

Le pointillé rond indique le début de la fermeture des bronchioles. (Volume courant (VC), volume de réserve inspiratoire (VRI), volume de réserve expiratoire (VRE), volume résiduel (VR), capacité fonctionnelle résiduelle (CFR), capacité vitale (CV), capacité pulmonaire totale (CPT), volume de fermeture (VF) et la capacité de fermeture (CF)). Image redessinée, modifiée et inspirée de Wikipedia [1, 7]

## 2.1.5 La circulation pulmonaire

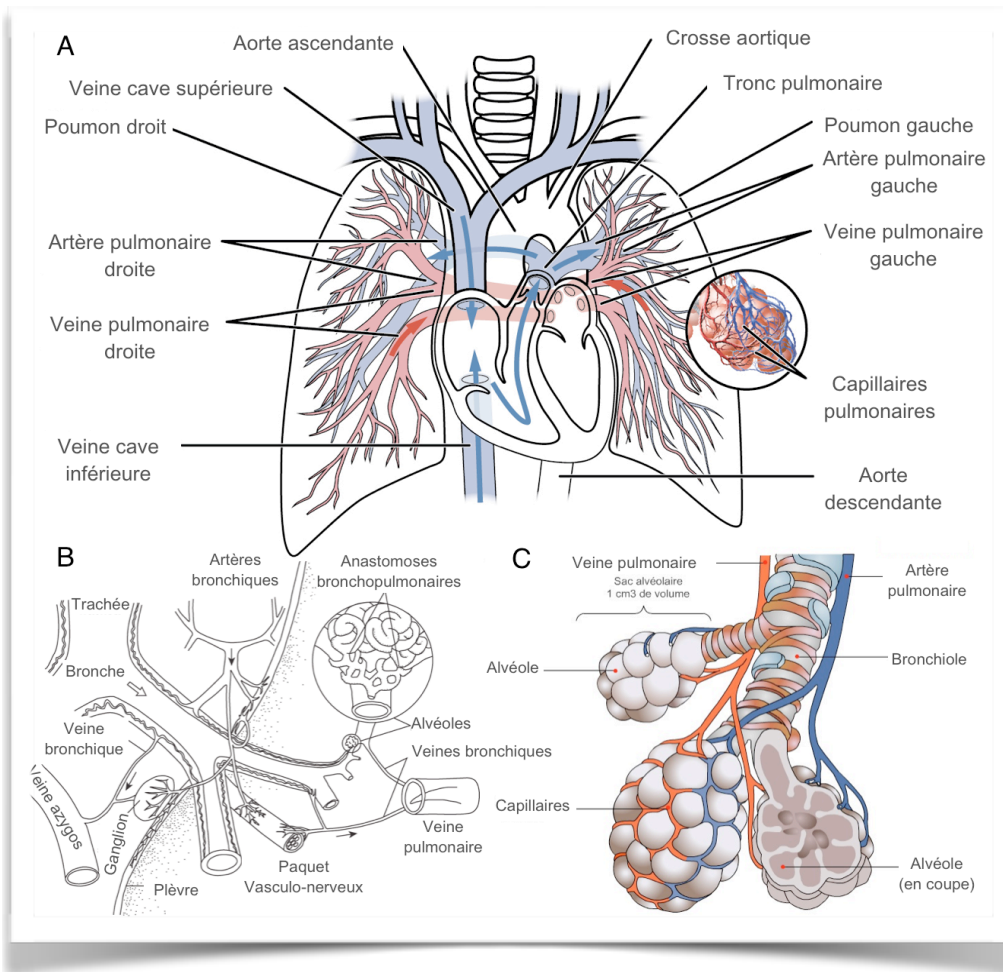
### 2.1.5.1 Physiologie vasculaire pulmonaire

Le poumon est un organe très vascularisé formé d'une microcirculation (capillaires alvéolaires) et d'une macrocirculation (vaisseaux extra-alvéolaires). Il contient en moyenne entre 200 à 300 ml de sang par mètre carré de surface corporelle ce qui représente 10 % du volume sanguin total. À ce volume, selon le niveau d'hydratation et la position corporelle, on estime que seulement 30-50 % du lit vasculaire est perfusé au repos [1]. Le sang est acheminé aux poumons grâce à la circulation pulmonaire et bronchique. La circulation pulmonaire reçoit du ventricule droit, via l'artère pulmonaire, approximativement 100 % du flux sanguin à un débit moyen au repos

de 3,5 litres par minute par mètre carré de surface corporelle [3]. À ce débit, le sang voyagera à travers les capillaires pulmonaires où il rejoindra les veines pulmonaires pour finalement atteindre le ventricule gauche via l'oreillette gauche. Par la suite, le sang regagnera la circulation systémique par l'intermédiaire de l'aorte : lieu où prend origine la circulation bronchique (figure 3A). Cette circulation parallèle chemine le long des parois bronchiques et représente 1 à 2 % du débit cardiaque ventriculaire gauche [8]. Sous tension élevée, cette perfusion permettra l'acheminement du sang artériel vers les structures pulmonaires (les voies aériennes, la plèvre et la paroi des artères pulmonaires). Il est clairement établi que malgré son petit volume, celle-ci possède un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité pulmonaire et de ses fonctions métaboliques (figure 3B) [8].

La circulation pulmonaire est unique en son genre puisqu'elle est définie par un système à basse résistance (rapport 1/6), à basse pression (rapport 1/9), à haute densité et à haut débit lorsqu'elle est comparée à la circulation systémique [1]. Ces caractéristiques permettront à celle-ci de maintenir, au repos, des pressions artérielles pulmonaires moyennes (PAPm) oscillant autour de 15 mm de Hg. Le flux moyen pour sa part vacillera à près de 3,5 litres par minute par mètre carré de surface corporelle ce qui optimisera le transit des érythrocytes. Dans ces conditions physiologiques, ceux-ci prendront approximativement 4-5 secondes pour passer de la valve pulmonaire à l'oreillette gauche. Lors de ce trajet, ils demeureront environ  $\frac{3}{4}$  de seconde au sein du réseau de capillaires où ils seront en étroit contact avec deux ou trois alvéoles pulmonaires [5]. Ce rapide transit généré par ce système suffira pour accomplir l'équilibre de l'oxygène et du dioxyde de carbone entre le gaz alvéolaire et le sang présent dans les capillaires. De toute évidence, ce tour de force en efficacité ne pourrait être possible sans les caractéristiques intrinsèques de la structure vasculaire pulmonaire.

De plus, l'arbre vasculaire pulmonaire ne bifurque pas de manière symétrique, ce qui peut être expliqué par le fait que chaque vaisseau mère ne produit pas de façon égale deux vaisseaux semblables. Le modèle de bifurcation est décrit par le ratio de ramification du système Strahler [9]. Ce ratio se situe proche de 3 dans le cas de l'arbre vasculaire pulmonaire humain expliquant ainsi l'asymétrie présente [1, 5, 9]



**Figure 3. Physiologie pulmonaire**

**Anatomie de la macrocirculation pulmonaire (A). Anatomie de la circulation bronchique (B). Anatomie de la microcirculation pulmonaire (C). Image adaptée de Michael G. Levitzky[1]. Reproduction autorisée.**

### 2.1.5.2 Structure artères/capillaires/veines

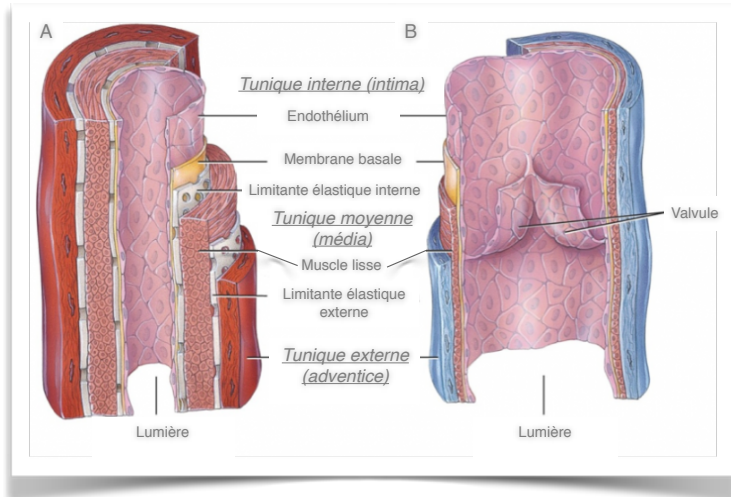
Le lit vasculaire pulmonaire comporte différents types de vaisseaux : les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines qui possèdent chacun leurs propres caractéristiques spécifiques selon leurs fonctions respectives. La paroi de ces vaisseaux est composée de l'intérieur vers l'extérieur de trois couches morphologiquement distinctes: l'intima, la média et l'adventice (figure 4A-4B) [10].

En contact direct avec le sang, l'*intima* représente la couche la plus interne du vaisseau. Cette fine tunique est composée essentiellement d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) déployées sur une membrane basale (tissu conjonctif) lui servant de support. À même le poumon, en raison des changements de pression requis par la mécanique respiratoire, la morphologie des cellules endothéliales vasculaires diffèrera entre la micro et la macrocirculation pulmonaire [11].

Bordée par les limitantes élastiques interne et externe, la *média* est essentiellement composée de fibres d'élastine et de fibres de collagène et se distingue principalement par la présence de cellules musculaires lisses (CML). Ces cellules auront une fonction importante dans la régulation du calibre des vaisseaux et le tonus vasomoteur. Finalement, l'*adventice* est élaborée d'élastine, de collagène, de fibroblastes, de macrophages et de terminaisons nerveuses [10]. Elle a un rôle de soutien et de protection.

Par ailleurs, l'importance de ces tuniques est variable selon le genre de vaisseau et conditionneront la fonction vasculaire [10]. Par conséquent, les artères élastiques ou conductrices auront une média plus développée avec une structure plus riche en collagène, en élastine et en fibres musculaires lorsque comparée aux capillaires qui eux sont exempts de la couche musculaire et de l'adventice. D'autre part, lorsque mis en parallèle avec le système systémique, les artères et

artérioles pulmonaires se distinguent par un nombre moins élevé de cellules musculaires lisses. Cette caractéristique propre à la circulation pulmonaire se traduira par une faible résistance et une forte capacité de compliance au niveau basal [10].



**Figure 4. Structure d'un vaisseau**

**Structure comparée entre une artère (A) et une veine (B) [3]. Reproduction autorisée.**

### 2.1.5.1 Hétérogénéité de la circulation pulmonaire

La perfusion pulmonaire est décrite de façon physiologique comme étant hétérogène. Nous savons aujourd'hui que cette hétérogénéité doit entre autres sa présence aux forces gravitationnelles qui influent sur les résistance vasculaire pulmonaire (RVP). Deux théories grandement acceptées à ce jour : le « Slinky Effect » et le « Zonal Model (West) » expliquent en partie les raisons de cette perfusion hétérogène gravité-dépendante. Toutefois, la persistance des gradients dans des conditions isogravitationnelles a suscité beaucoup de questionnements au sein de la communauté scientifique. D'après une troisième théorie formulée dans les années 1990 par le chercheur RW Glenny, l'hétérogénéité isogravitationnelle serait due en grande partie à l'architecture fractale de l'arbre pulmonaire (section 2.1.5.2.2.4) [12]. Les prochaines sections traiteront de l'homéostasie hémodynamique et des divers facteurs responsables de l'hétérogénéité de la perfusion pulmonaire.

**Info PulmoBind :** La distribution spatiale du PB et sa captation dépendent grandement des facteurs pouvant affecter la circulation pulmonaire. Par conséquent, la section suivante permettra de faire un survol de l'ensemble des mécanismes pouvant affecter la dynamique circulatoire pulmonaire.

## 2.1.5.2 Homéostasie et régulation de la circulation pulmonaire

Selon la loi de Poiseuille, au moment de l'écoulement d'un liquide dans un système de conduction, la pression est égale à la résistance multipliée par le débit [13]. Par conséquent, pour maintenir une pression stable face à un débit variable, le poumon devra ajuster ses résistances. La RVP est essentiellement localisée au niveau de la microcirculation et en particulier dans les petites artères précapillaires de diamètre inférieur à 200-300  $\mu\text{m}$  [14]. Elle sera contrôlée par des mécanismes passifs dont le débit cardiaque, le volume pulmonaire, la gravité ou bien par des mécanismes actifs tels que l'hypoxie, le système nerveux et les substances vasoactives. Cette fluctuation des résistances par ces mécanismes aura un impact indéniable sur la distribution spatiale du volume sanguin. La quantification de la RVP ne peut être obtenue que par cathétérisme cardiaque. La valeur normale de celle-ci se situe entre 70-160  $\text{dynes}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$  [15].

### 2.1.5.2.1 Les mécanismes passifs

#### 2.1.5.2.1.1 Le débit cardiaque

De tous ces facteurs pouvant affecter les RVP, le débit cardiaque est le plus important. Lorsque celui-ci s'accroît, les tensions au niveau de la vasculature pulmonaire varient très peu. Cela s'explique par le fait que le poumon de façon passive possède la faculté de diminuer ses résistances face à une augmentation du débit. Ceci est possible grâce à la forte capacité de distension (compliance) des capillaires ouverts (Figure 5A), mais également au moyen d'un autre phénomène



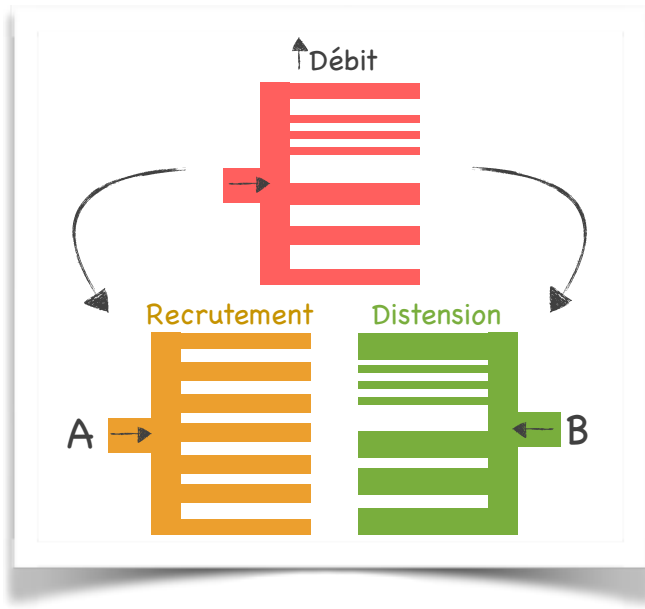
que l'on nomme le recrutement des capillaires fermés (Figure 5B). À eux deux, ces mécanismes passifs constituent les principaux moyens d'adaptation aux élévations des débits cardiaques [16].

#### **2.1.5.2.1.2 La compliance et l'élastance**

Le battement cardiaque génère une éjection sanguine pulsatile. C'est grâce à la compliance du système vasculaire qu'il est possible de convertir ce flux discontinu en un flux continu. La compliance se définit comme étant la capacité que possède un corps à s'étirer et se distendre (figure 5B). À l'inverse, l'élastance s'oppose à la compliance. Le coefficient d'élasticité se traduit par la faculté que détient un vaisseau à revenir à sa position initiale suite à une déformation [16].

#### **2.1.5.2.1.3 Le recrutement vasculaire**

Sous des conditions physiologiques, il existe à l'échelle pulmonaire des capillaires ouverts ainsi que des capillaires fermés. Par conséquent, au repos les territoires pulmonaires ne seront pas perfusés de manière identique. Dans le contexte où le débit vasculaire s'élève (lors d'un effort), ces capillaires au « repos » seront sollicités et recrutés pour abaisser les RVP et maintenir l'équilibre de ce système à basse pression (figure 5A) [16].



**Figure 5. Distension et recrutement vasculaire**

Schématisation des mécanismes passifs de la diminution des RVP par (A) le recrutement et par (B) distension face à une augmentation du débit circulaire. Image redessinée, modifiée et inspirée de Levitzky 2013 [1]

## 2.1.5.2.2 La gravité et la posture

La gravité ainsi que la posture peuvent avoir une répercussion significative sur la fonction pulmonaire en influant sur : les volumes pulmonaires, la densité tissulaire, la pression intra pleurale, la distribution spatiale de la circulation sanguine et la ventilation. Dans cette section, il sera question de l'effet gravitationnel et positionnel du corps sur l'hémodynamie et la fonction pulmonaire.

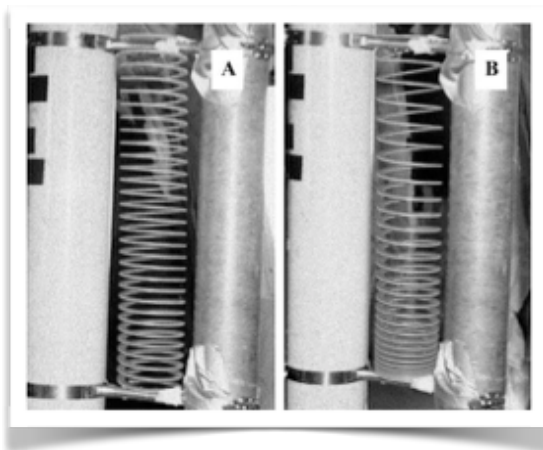
### 2.1.5.2.2.1 Déformation tissulaire et compliance

C'est en effectuant des études dans des conditions de micro ( $\mu\text{G}$ ) et d'hypergravité ( $>1\text{G}$ ) lors de voyages spatiaux ou au cours de vols paraboliques qu'il a été possible de mieux caractériser l'influence de la pesanteur sur la fonction respiratoire. Le vol parabolique est en effet le seul moyen terrestre nous permettant pour une vingtaine de secondes maximum de reproduire une situation de  $\mu\text{G}$ . Observé lors de ces études, un des impacts importants de la gravité au sein de l'organisme a été son effet sur la déformation tissulaire.

Cette déformation pourra être variable et dépendra de la compliance du tissu et de l'organe. Sous l'effet de son propre poids et des forces gravitationnelles, la structure tissulaire des organes internes subira un changement de conformation qui peut être comparé à un ressort. Ce phénomène, gravité-dépendant, est expliqué par un modèle conceptuel appelé : « Slinky Effect » [17]. La compliance pulmonaire étant élevée, les poumons seront fortement sensibles aux déformations.

#### 2.1.5.2.2.1.1 « Slinky Effect »

Dans ce modèle représenté à la figure 6, on illustre la déformation de deux ressorts soumis à des forces gravitationnelles différentes lors d'un vol parabolique. Ces travaux ont démontré qu'en absence de gravité (0 G), telle qu'expliquée à la figure 6A, la distribution des spires du ressort est tout à fait uniforme comparativement à la figure 6B où l'application d'une force équivalente à 2G a pour conséquence de redistribuer les spires dans le sens de la pesanteur. Cette déformation de la structure face aux forces gravitationnelles se traduira au niveau pulmonaire par une augmentation de la densité tissulaire aux bases. Ceci aura pour impact d'augmenter la compliance, la pression intra pleurale, la perfusion et la ventilation dans cette région.



**Figure 6. Densité tissulaire et le « Slinky effect »**

**La figure démontre qu'en absence de gravité (0 G), telle qu'illustrée en A, la distribution des spires du ressort est tout à fait uniforme comparativement en B où l'application d'une force équivalente à 2G entraînera une redistribution des spires dans le sens de la pesanteur. Photo tirée de Hopkins, S. R. Reproduction autorisée. [17]**

#### 2.1.5.2.2.1.2 Théorie de « WEST »

En position verticale, les pressions vasculaires ainsi que le débit sanguin augmentent de l'apex vers les bases par l'effet de la pression hydrostatique. On appelle pression hydrostatique la pression qui règne au sein d'un liquide en équilibre et qui est due à son propre poids. Par conséquent, si on considère le système artériel comme une colonne continue de sang, la différence de pression entre l'apex et la base d'un poumon de 30 cm de hauteur sera de 30 cm d'eau soit environ 23mm Hg (figure 7A). Cette forte différence de pression pour ce système à basse pression entraînera une perfusion régionale caractérisée par 4 différentes zones. Celles-ci furent décrites pour la première fois il y a plus de 50 ans par West et ont été peaufinées par Hughes quelques années plus tard [5, 18]. Elles dépendent des différences qui subsistent entre les pressions artérielles pulmonaires (PAP), alvéolaires (Pa), veineuses (PVP) et interstitielle (Pisf). Il n'existe pas de limites anatomiques fixes de ces zones puisqu'elles sont influencées entre autres par la position corporelle, mais aussi par la Pa qui varie pendant le cycle respiratoire et la PAP qui fluctue en fonction du cycle respiratoire et du débit cardiaque. Ces zones sont définies par les zones 1, 2, 3 et 4.

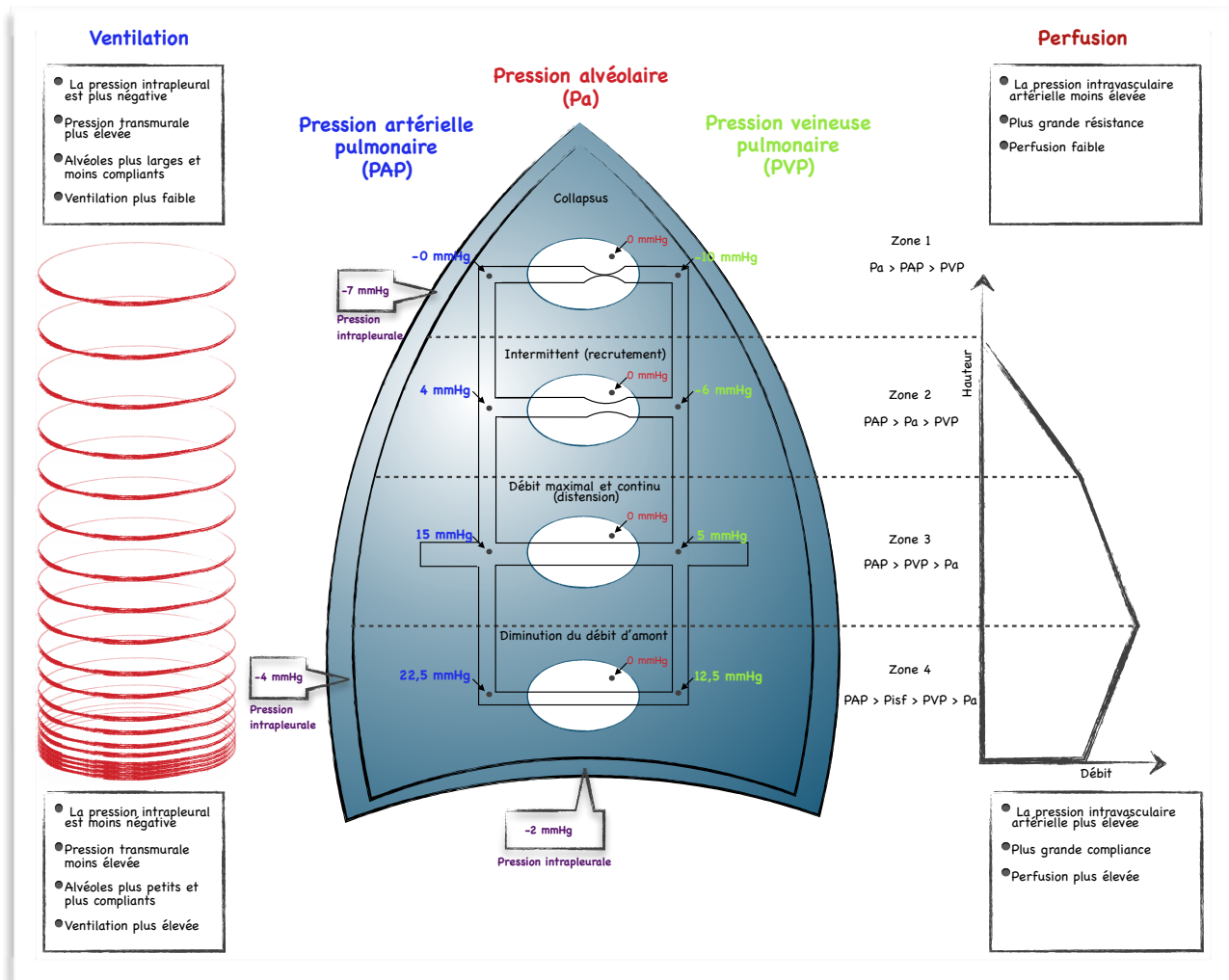


Figure 7. Modèle de West et Hughes

Ce modèle montre que dans la zone apicale, la pression de perfusion pulmonaire est quasi inexistante, puisque la pression artérielle pulmonaire est inférieure à la pression alvéolaire. Dans la zone 2, zone de recrutement, les pressions sont équilibrées et l'ouverture des capillaires y est intermittente. Dans la zone 3, les capillaires sont distendus et la perfusion est optimale. Enfin, dans la région basale, c'est le poids du tissu pulmonaire soumis au vecteur gravité qui restreint localement la circulation. La déformation tissulaire pulmonaire est illustrée à gauche par l'image du ressort. Pression interstitielle pulmonaire (Pisf). Image redessinée, modifiée et inspirée de West JB [5, 19]

### **Zone 1 ( $P_a > P_{AP} > P_{VP}$ )**

La présence d'une pression artérielle pulmonaire inférieure à celle alvéolaire aura pour effet d'entraîner le collapsus des capillaires sanguins. De ce fait, cette zone constituera un espace mort physiologique bien ventilée, mais mal perfusée. En raison du débit quasi absent, les échanges gazeux seront inexistantes. Cette zone n'est pas présente chez les sujets sains, car en général la pression artérielle pulmonaire est suffisante pour éviter le collapsus. Toutefois, cette zone intervient principalement dans des états pathologiques tels que l'hypovolémie (hémorragie), l'hypoxémie ou lors d'une hausse des pressions alvéolaires. Celles-ci peuvent augmenter au cours d'une ventilation mécanique lorsqu'une pression respiratoire positive (PEP) est utilisée. [5]

### **Zone 2 ( $P_{AP} > P_a > P_{VP}$ )**

La zone 2 constitue un secteur intermédiaire qui participe au processus de recrutement lors de l'augmentation du flot sanguin. Le débit est faible ou intermittent et les vaisseaux sont semi-fermés. Ceux-ci s'ouvrent ou se ferment en fonction de la pression présente et de la compliance pulmonaire. [5]

### **Zone 3 ( $P_{AP} > P_{VP} > P_a$ )**

À l'inverse de la zone 1 et 2, la perfusion alvéolaire est maximale en raison du débit maximal et continu et de la gravité. [5]

#### **Zone 4 (PAP > P<sub>isf</sub> > PVP > Pa)**

Le faible volume pulmonaire dans cette région favorisera l'augmentation des fluides et par conséquent l'accroissement de l'espace interstitiel pulmonaire. Par le fait même, la pression interstitielle pulmonaire deviendra positive et augmentera les résistances vasculaires extra-alvéolaires. Ainsi, l'élévation des résistances diminuera le débit sanguin (rétrécissement des vaisseaux extra-alvéolaires lorsque le poumon est peu distendu (voir figure 8)) [5]. Bref, la pression artériointerstitielle joue un rôle déterminant dans cette zone 4.

#### **2.1.5.2.2 Les volumes pulmonaires**

Les volumes pulmonaires constituent également un autre facteur passif pouvant faire varier les RVPs. Ils agiront de manière opposée sur les vaisseaux extra et intra-alvéolaires ce qui affectera la dynamique circulatoire. Ainsi, la hausse du volume pulmonaire aura pour répercussion de diminuer la surface des vaisseaux alvéolaires par un effet d'étirement. En revanche, la tension radiale accrue amènera une hausse du calibre des vaisseaux extra-alvéolaires. Donc, à haut volume les RVPs s'élèvent par l'augmentation des résistances vasculaires alvéolaires, alors qu'à bas volume pulmonaire, les RVPs s'accroissent par l'élévation de la résistance vasculaire extra-alvéolaire (figure 8). Somme toute, il a été démontré qu'une perturbation de la ventilation pulmonaire peut avoir un effet significatif sur la distribution spatiale de la circulation dans le but de maintenir le ratio ventilation/perfusion [14].

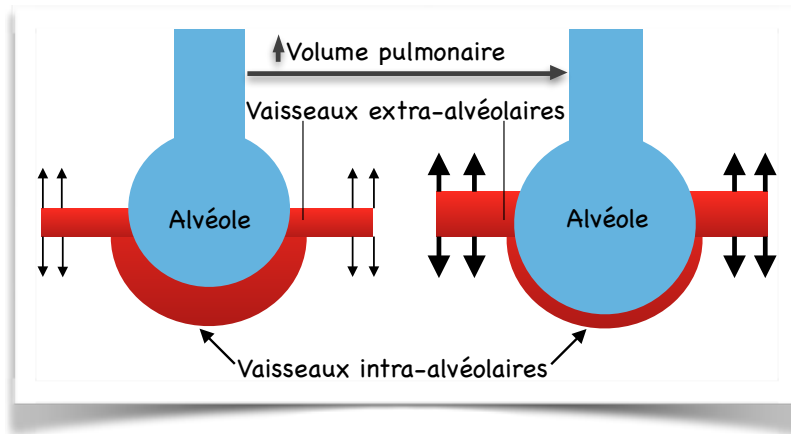


Figure 8. L'impact des volumes pulmonaires sur la perfusion pulmonaire

Cette figure démontre que les vaisseaux extra-alvéolaires sont sensibles à la pression pleurale tandis que les vaisseaux intra-alvéolaires sont plutôt sensibles à la pression alvéolaire. Cette réalité affectera du même coup les résistances pulmonaires et la distribution spatiale sanguine au niveau pulmonaire. Image dessinée et inspirée de Levitzky 2013 [1].

### 2.1.5.2.2.3 Les facteurs modifiant les volumes pulmonaires

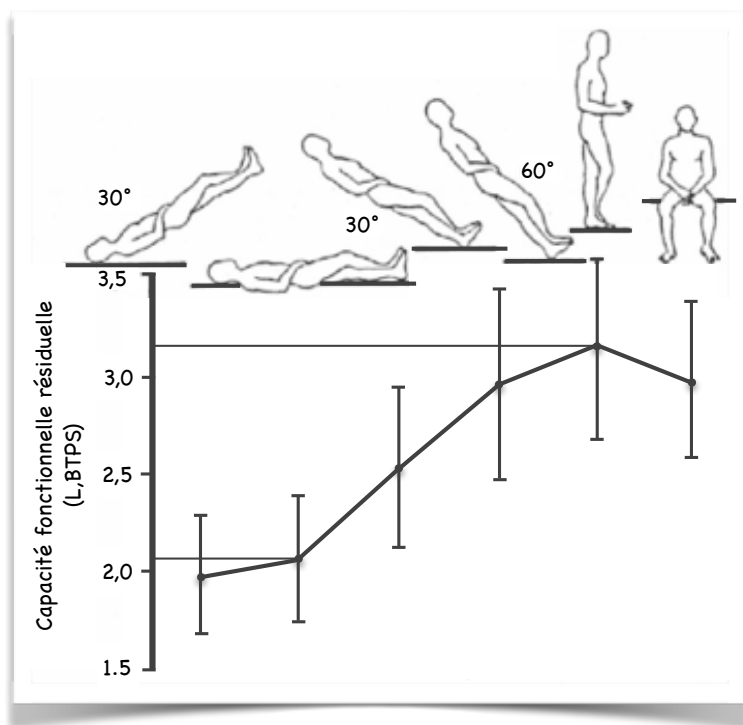
#### 2.1.5.2.2.3.1 La position corporelle

En position debout ou assise, la ventilation pulmonaire est hétérogène et concentrée au niveau des bases tout comme la perfusion. La source de cette différence régionale émane de la pression intra pleurale et de la compliance pulmonaire qui sont majorées aux bases sous l'effet de la pesanteur. Cependant, cette hétérogénéité spatiale pourra être modulée lors de la modification des forces gravitationnelles ou lors d'un changement positionnel.

Comme mentionné dans la section précédente, chaque organe interne, au niveau thoracique et abdominal, possède une compliance et une capacité à se déformer sous l'effet de leur propre poids, de par l'influence de la gravité et de la posture. C'est ainsi que le cœur, la graisse viscérale et le contenu abdominal seront les principaux acteurs qui affecteront de façon variable les volumes pulmonaires selon la position corporelle. De ce fait, c'est la position verticale qui offrira chez



l'homme le moins de résistance. On observera une diminution progressive de la compliance thoracique et de la CFR lors d'un passage progressif de la position debout à couchée (figure 9). Cette hausse des résistances thoraciques s'explique par l'élévation de la compliance de l'abdomen, du cœur et de la graisse viscérale en décubitus dorsal. L'augmentation de la compliance de l'abdomen est aussi observable en position debout en apesanteur face à la perte de gravité, ce qui élève également les résistances thoraciques. La schématisation des dynamiques internes en fonction des diverses positions corporelles est représentée à la figure 9 [20]. Cette figure se veut être un résumé des éléments environnementaux intra thoraciques pouvant affecter la capacité respiratoire.



**Figure 9. Influence de la posture sur la capacité résiduelle fonctionnelle**

**On observe que la posture affecte la CFR, par conséquent l'humain atteindra sa CFP maximale en position debout et minimale en position Trendelenburg. Image redessinée et inspirée de [20]. Reproduction autorisée.**

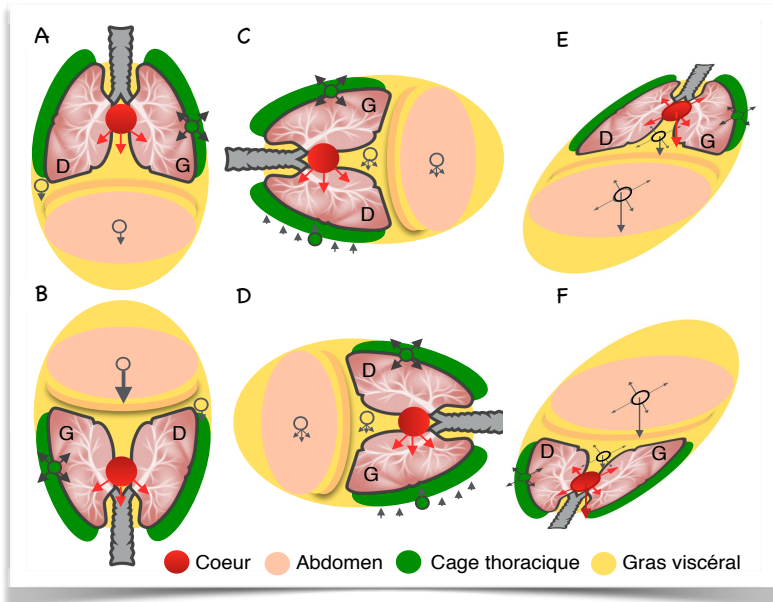


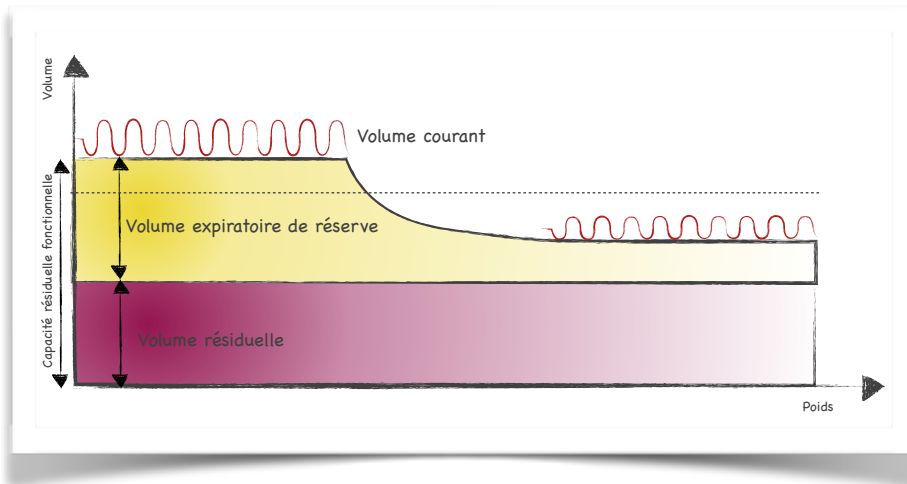
Figure 10. Effet de la posture sur la dynamique interne

En raison des forces gravitationnelles, les organes se déforment sous l'action de leur propre poids ce qui affectera la fonction pulmonaire. La position verticale permet de favoriser la déformation des organes vers le bas (A). Cette déformation affecte très peu la compliance thoracique et permet d'atteindre une CFR maximale. À l'opposé, une position suspendue tête en bas entraînera une déformation des organes en direction pulmonaire diminuant ainsi la compliance de la paroi thoracique (B). Pour sa part, la position latérale amènera également une baisse de la compliance thoracique, mais cette fois-ci principalement à cause du cœur, de la graisse viscérale et de la diminution de la capacité d'expansion du côté couché (C)(D). La position dorsale et ventrale affectera la dynamique pulmonaire notamment en raison de l'abdomen, du cœur et de la réduction de la compliance thoracique principalement lors d'une position ventrale (E)(F). Image dessinée.

D'autres facteurs non négligeables peuvent venir affecter les volumes respiratoires, comme le poids, l'âge et la taille.

### 2.1.5.2.2.3.2 L'obésité

L'impact de l'obésité sur la fonction respiratoire n'est pas négligeable et peut même amener un état d'hypoventilation. C'est l'obésité abdominale et viscérale qui nuisent principalement à la fonction pulmonaire par la diminution de la compliance thoracique. En comparaison, la graisse en partie inférieure du corps est moins associée à des symptômes respiratoires. De plus, l'augmentation du volume sanguin pulmonaire associé à l'obésité entraîne quant à elle une diminution de la compliance pulmonaire. Ces diminutions de compliance causeront une diminution de la CPT, une diminution de la CRF, une diminution du VC, une diminution du VRE et un maintien du VR (figure 11) [21].



**Figure 11. Effet de l'obésité sur les volumes respiratoires**

**La figure démontre une diminution de la CPT, une diminution de la CRF, une diminution du VC, une diminution du VRE et un maintien du VR lors de l'augmentation de la masse grasseuse. Image redessinée, modifiée et inspirée de Rao [22]. Reproduction autorisée.**

### **2.1.5.2.2.3.3 Le vieillissement**

Pour sa part, le déclin de la fonction respiratoire avec l'âge n'est pas linéaire. Le système pulmonaire subit une régression progressive avec le vieillissement se traduisant par des modifications anatomiques et fonctionnelles qui s'exercent à tous les niveaux (tableau 1) [23]. La cage thoracique se rigidifie entraînant une baisse de la compliance thoracique. Les volumes pulmonaires mobilisables diminuent avec le temps alors que la capacité pulmonaire totale reste stable [24, 25]. Il y aura également une réduction de la CV, du VEMS et du débit de pointe et une élévation du volume de fermeture et du VR. De plus, chez le sujet âgé, la fermeture prématurée des voies respiratoires, de façon plus marquée dans les régions inférieures, aura pour effet de redistribuer l'air inspiré aux apex altérant ainsi le ratio V/Q. L'ensemble de ces modifications associé avec la perte de compliance des vaisseaux sanguins avec l'âge affecteront de façon évidente le patron physiologique de la perfusion pulmonaire.

<b>Caractéristiques du vieillissement</b>	
<b>Fonctionnelle</b>	<b>Tissulaire</b>
Réduction de la capacité vitale, stabilité de la capacité pulmonaire totale	Modification du parenchyme pulmonaire sans changement de masse
Augmentation de l'espace mort physiologique	Augmentation de la dimension des sacs alvéolaires
Diminution de la réactivité bronchique	Réduction de la densité capillaire pulmonaire
Augmentation de la compliance pulmonaire	Diminution des masses musculaires respiratoires
Diminution de la compliance thoracique	Diminution de la clairance mucociliaire
Augmentation du volume de fermeture	Immunosuppression
Faible diminution de la PaO <sub>2</sub>	Diminution de la masse de muscle lisse.
Augmentation de l'hétérogénéité des rapports V/Q	
Diminution de DLCO	
Réduction de la réponse ventilatoire à l'hypoxie, l'hypercapnie	
Diminution des pressions maximales expiratoire et inspiratoire	

Tableau 1. Caractéristiques fonctionnelles et tissulaires du vieillissement pulmonaire. Tableau tiré de H. Guénard [23]

#### **2.1.5.2.2.3.4 La taille**

La taille est considérée comme le déterminant prédictif majeur de la fonction pulmonaire, quel que soit l'âge ou le sexe [26]. Il a même été démontré que la baisse de la fonction respiratoire en rapport avec l'âge pouvait s'expliquer également par la perte de taille due au vieillissement. Bref, la fonction pulmonaire dépend de la morphologie du corps (la taille et la longueur du tronc) [23, 27].

#### **2.1.5.2.2.4 Le modèle fractal**

Quel point en commun y a-t-il entre un flocon de neige, des réseaux de rivières, un chou-fleur, l'intestin grêle, un brocoli et nos poumons ? À première vue la question peut sembler étrange, toutefois ces éléments énumérés ci-haut sont des exemples de fractale. Dans les années 1960, le mathématicien Benoit Mandelbrot définissait pour la toute première fois le mot « fractale » pour désigner des objets dont la géométrie complexe et auto-similaire ne pouvait être mesurée par une dimension entière [28].

L'arbre pulmonaire représente une structure arborescente auto-similaire où les vaisseaux de petite taille sont semblables à ceux de taille supérieure. Les ramifications et bifurcations sont régies par un désordre non symétrique qui respecte une architecture fractale. Cette disposition géométrique permet au poumon d'accroître sa surface d'échanges tout en permettant de minimiser l'effort cardiaque, la quantité de sang nécessaire et le volume pulmonaire.

La persistance des gradients de perfusion dans un environnement isogravitationnel a été une source de débat important dans la littérature. Glenny et Robertson (1991) ont grandement étudié l'impact des ramifications et de la géométrie pulmonaire sur la distribution du flot sanguin dans les axes gravité-indépendant [29]. Au cours de leurs travaux, ils ont été en mesure d'observer que la

géométrie vasculaire pulmonaire produisait une hétérogénéité gravité indépendante qui corrélait significativement avec les débits de perfusion. Un modèle fractal a alors été proposé [12]. D'autre part, des études supplémentaires ont démontré la stabilité du patron de bifurcation en fonction de l'âge et de l'implication de la génétique comme puissant déterminant sur la variation de la géométrie pulmonaire [30, 31].

Ce modèle donne beaucoup moins d'importance aux répercussions de la gravité sur la distribution de la perfusion pulmonaire et certaines écoles de pensée attribuent tout près de 75 % de l'hétérogénéité pulmonaire au modèle fractal [32].

### **2.1.5.2.3 Les mécanismes actifs**

#### **2.1.5.2.3.1 L'hypoxie**

L'endothélium ainsi que les fibres musculaires lisses sont très sensibles à l'hypoxie. Par conséquent, dans le but de maintenir le rapport de ventilation sur perfusion (V/Q), les territoires mal ventilés réagiront par une vasoconstriction des artérioles et des veines pulmonaires (vasoconstriction hypoxique). En réponse à la baisse des pressions partielles en oxygène, le débit artériel pulmonaire diminuera pour ainsi favoriser une redistribution de la perfusion vers les zones bien ventilées. Ce mécanisme de défense peut être bénéfique en cas d'hypoxie alvéolaire localisée, mais peut devenir délétère en période d'hypoxémie chronique comme cela est le cas de façon transitoire pour les habitants en haute altitude. Dans cette situation, il y aura un épaississement de la média entraînant une HTP chronique qui sera dans la plupart des cas réversible lors d'un retour à une élévation plus près du niveau de la mer [33, 34].

#### **2.1.5.2.3.2 L'endothélium vasculaire pulmonaire**

D'un point vu de son nombre de cellules ( $6 \times 10^{13}$ ), de son poids (1,5kg) (1 % de la masse corporelle) et de sa taille ( $130\text{m}^2$ ), l'endothélium est reconnu comme étant le plus grand organe autonome [17]. Selon la partie du corps, l'endothélium se présentera sous sa forme continue (poumon), fenestrée (reins-intestins) ou bien discontinuée (foie-rate) [35]. Longtemps considéré comme une surface inerte, il est maintenant bien démontré que cette barrière unique et multifonctionnelle possède un rôle important au niveau de l'angiogenèse, de la coagulation sanguine, de la perméabilité vasculaire, de l'adhésion des leucocytes ainsi que dans la croissance des cellules musculaires lisses. Il participera activement à l'homéostasie hémodynamique en affectant les RVP par la synthèse, la dégradation ou bien l'inactivation de nombreuses substances

vasoactives. C'est suite à divers stimuli (mécanique, humoral, neuronal ou bien l'état d'hypoxie) que les cellules endothéliales à l'aide des médiateurs (NO, l'EDHF et les PGI<sub>2</sub>) ou via leurs jonctions myoendothéliales stimuleront la relaxation du muscle lisse. Un fait fascinant; l'endothélium pulmonaire est hétérogène et cette différence se situe principalement entre l'endothélium alvéolaire et celui extra-alvéolaire [35]. Les cellules endothéliales de ces derniers exprimeront des protéines, des canaux, des transporteurs et des récepteurs distincts en raison des rôles différents qu'ils doivent accomplir.

**Info PulmoBind :** Il a été bien démontré que les récepteurs à l'adrénomédulline sont exprimés au niveau de l'endothélium alvéolaire ainsi qu'extra-alvéolaire. Par conséquent, le PB aura comme avantage de pouvoir imager tant la micro que la macro circulation pulmonaire.

Les principaux transporteurs, récepteurs et médiateurs présents au niveau de l'endothélium et de la couche musculaire lisse sont illustrés à la figure 12. Ces acteurs jouent un rôle important dans l'homéostasie pulmonaire et systémique et peuvent faire l'objet d'une cible potentielle dans le développement de nouveaux radiotraceurs. Il en sera question dans une section subséquente (section 3.2).

## **2.1.5.2.3.2.1 Les principaux mécanismes de l'endothélium vasculaire**

### **2.1.5.2.3.2.1.1 Mécanisme du NO**

En présence d'un stimulus, il y a une augmentation du calcium intracellulaire. Celui-ci se lie alors à la calmoduline et activera l'oxyde nitrique synthase (eNOS-3). Cette activation entraînera la synthèse d'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine. Le NO diffuse par la suite dans les cellules musculaires lisses où il active la guanylyl cyclase soluble qui permettra la formation de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) à partir de la guanosine triphosphate (GTP). Le cGMP se lie à la



protéine kinase G (PKG), ce qui réduit l'influx calcique et la vasoconstriction calcium-dépendant. De plus, la PKG peut aussi inhiber la phosphodiesterase diminuant du même coup la dégradation de la cGMP en GMP, ce qui favorisera la vasorelaxation (mécanisme d'action du Sildénafil qui permet d'inhiber la phosphodiesterase-5 (PDE5), un traitement utilisé dans l'HTAP) [36].

#### **2.1.5.2.3.2.2 Mécanisme du PGI<sub>2</sub>**

L'action vasodilatatrice de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), dérivée de l'acide arachidonique, s'opère par l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) qui est fortement stimulée par l'augmentation de la cAMP et du calcium intracellulaire [37]. Les effets de la PGI<sub>2</sub> sont intimement liés à ceux du NO. PGI<sub>2</sub> facilite la libération endothéliale de NO qui, en retour, potentialise l'action de la PGI<sub>2</sub> sur la couche musculaire lisse par l'inhibition de la phosphodiesterase. L'adénylyl cyclase (AC) sera par la suite activée par la PGI<sub>2</sub> via son récepteur et il s'en suivra une augmentation de cAMP et une vasodilatation [38]. Toutefois, la contribution de la PGI<sub>2</sub> à la relaxation endothélium-dépendante est beaucoup moins importante que celle du NO. Cette voie sera également celle qui sera ciblée dans le traitement de l'HTAP. Le Flolan (epoprosténol) utilisé dans le traitement de l'HTAP est un exemple de médicament dont le principe actif est la stimulation de la cascade du PGI<sub>2</sub> [38].

#### **2.1.5.2.3.2.3 Mécanisme du EDHF**

Le facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF) stimule l'activation des canaux potassiques (BKca) présents au niveau des cellules musculaires lisses entraînant ainsi leur hyperpolarisation et leur relaxation [39]. La nature chimique du EDHF n'est toujours pas définitivement connue, cependant on suppose que celui-ci serait un métabolite obtenu lors de la transformation de l'acide arachidonique par les cytochromes P450. Ces métabolites sont appelés « epoxyeicosatetraenoic acids » (EETs) [40]. De plus, le EDHF semble être une voie de support lorsque le NO est insuffisant

ou incapable de faire son travail correctement. La déplétion du calcium au niveau intracellulaire aura pour effet d'augmenter la synthèse de EDHF par la hausse de l'activité des cytochromes P450.

### 2.1.5.2.3.2.3.1 Jonctions myoendothéliales

Les cellules endothéliales possèdent aussi la capacité de communiquer avec les cellules musculaires lisses via les jonctions myoendothéliales. Ces jonctions permettront de favoriser l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses afin de faciliter la vasodilatation [41]. Selon la littérature, des canaux potassiques calcium-dépendants existent au niveau de la jonction myoendothéliale. Ces canaux jouent un rôle important dans l'homéostasie du tonus vasculaire. L'augmentation du calcium intracellulaire activera les canaux potassiques et stimulera l'hyperpolarisation de la cellule. Les jonctions permettront donc le passage de l'influx vers la cellule musculaire lisse pour ainsi favoriser sa relaxation [41].

**Info PulmoBind :** Dans cette section nous avons discuté des divers mécanismes actifs et passifs pouvant affecter la circulation pulmonaire. De plus, nous avons exploré les effets de l'obésité, du vieillissement et de la taille sur les volumes respiratoires. En résumé, le débit cardiaque, les volumes respiratoires, l'âge, la taille, les forces gravitationnelles, l'architecture pulmonaire et la position corporelle pourront affecter la distribution spatiale de notre radiotraceur.

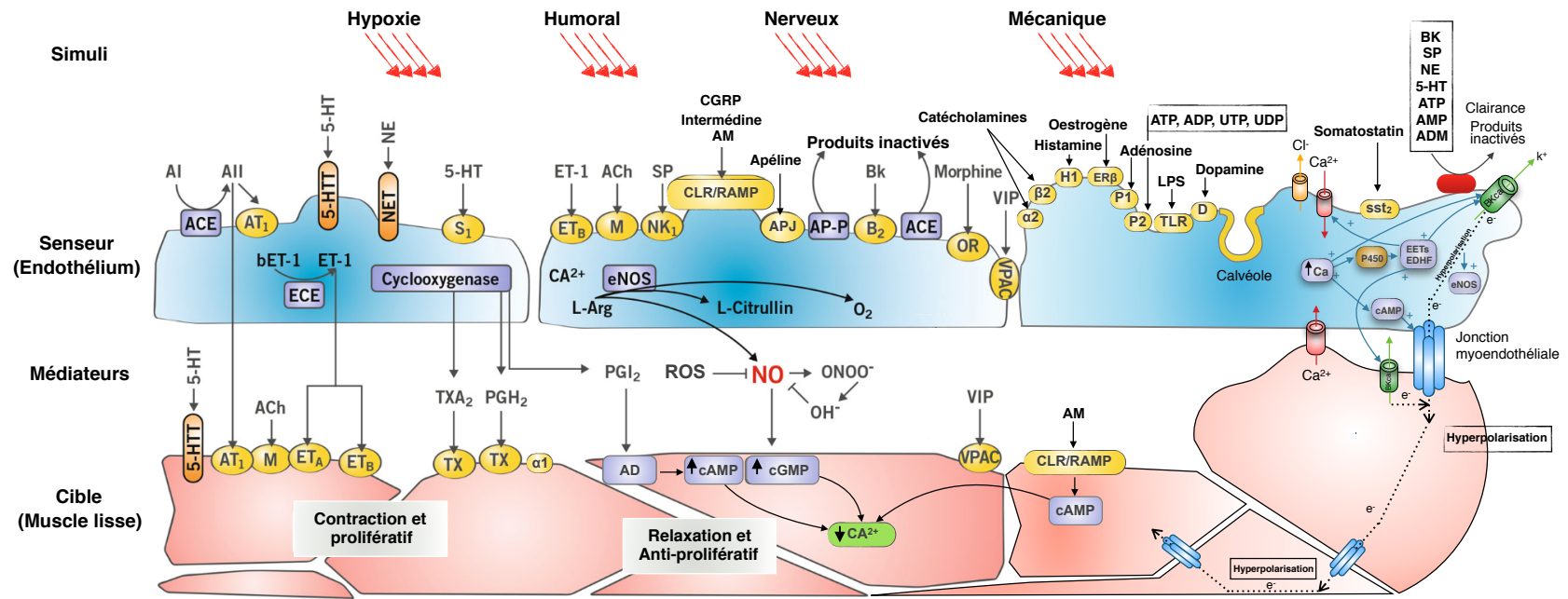


Figure 12. Fonction biologique de l'endothélium et de la couche musculaire lisse

Plusieurs médiateurs sont produits, transformés ou bien inactivés par les cellules endothéliales. Des récepteurs spécifiques et des transporteurs sont exprimés au niveau de l'endothélium et des cellules musculaires lisses. Oxyde nitrique (NO); facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF); acide epoxyeicosatriénoïque (EETs) prostacycline (PGI<sub>2</sub>); enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE); Adénylate cyclase (AD); acétylcholine (ACh); adrénomédulline (AM); angiotensine I (AI); angiotensine II (AII); récepteur à l'angiotensine (AT<sub>1</sub>); récepteur à l'apeline (APJ) bradykinine (Bk); peptide relié au gène calcitonine (CGRP); cyclo-oxygénase (COX); récepteur apparenté au récepteur de la calcitonine (CLR); enzyme de conversion de l'endothéline (ECE); récepteur de l'endothéline A and B (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>); endothéline-1 (ET-1); récepteur à l'estrogène β (ERβ); récepteur histaminique 1 (H1); L-arginine (L-Arg); lipopolysaccharide (LPS), prostaglandine H2 (PGH<sub>2</sub>); récepteur muscarinique (M); dérivé réactif de l'oxygène (ROS); récepteur sérotoninergique (S<sub>1</sub>); récepteur à la thromboxane (TH); thrombine (Thr); récepteur de type Toll (TLR); thromboxane A2 (TXA<sub>2</sub>); sérotonine (5-HT); récepteur opioïde (OR); protéine modifiant l'activité du récepteur (RAMP); récepteur neurokinine (NK-1); substance P (SP); récepteur du peptide intestinal vasoactif (VPAC); peptide intestinal vasoactif (VIP); aminopeptidase P (AP-P); transporteur à la norépinephrine (NET); norépinephrine (NE); récepteur dopaminergique (D). Image redessinée, modifiée et inspirée de Dupuis, J et al. [42] Reproduction autorisée.

# Chapitre 3

# L'Hypertension pulmonaire

## 3.1 Introduction à l'hypertension pulmonaire

L'HTP est une pathologie grave au pronostic sombre qui est caractérisée par un remodelage vasculaire complexe. En raison du caractère non spécifique de ses symptômes et de son diagnostic difficile, l'hypertension pulmonaire est une pathologie relativement récente dans l'histoire de la médecine. Elle fut décrite pour la première fois suite à une autopsie effectuée par le Dr Romberg en 1891 [43]. Cette maladie se définit par une élévation progressive des résistances pulmonaires ainsi qu'une PAPm au repos supérieure à 25 mm Hg mesurée par cathétérisme cardiaque droit. À terme, la maladie évoluera de façon variable vers une défaillance cardiaque droite et éventuellement le décès. On peut classer l'HTP en 5 groupes distincts.

## 3.2 Classification de l'hypertension pulmonaire

Pour faciliter les recommandations ainsi que la prise en charge des patients affectés d'HTP, les communautés scientifiques et médicales internationales ont décidé de mettre sur pied une classification qui comporte à ce jour 5 groupes (tableau 2). Pour ce faire, ils ont statué en se basant sur les modifications histologiques ainsi que sur l'étiologie de la maladie. Le groupe 1 se réfère à l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Les lésions histologiques typiques sont : une hypertrophie de la média, une prolifération de l'intima, un épaissement de l'adventitia, des infiltrats inflammatoires périvasculaires qui vont favoriser un remodelage artériel pulmonaire avec présence de lésions plexiformes et de thrombose in situ. L'origine peut être idiopathique, héréditaire ou reliée entre autres au VIH, à la prise de certains médicaments, à l'ingestion de toxines, à une maladie cardiaque congénitale, à une schistosomiase ou à une collagénose. Les autres groupes de cette classification ont une prévalence plus élevée et incluent notamment l'HTP secondaire à

l'insuffisance cardiaque gauche (groupe 2), secondaire à une affection pulmonaire ou hypoxique (groupe 3) ou secondaire à une maladie thromboembolique chronique (groupe 4). Un 5<sup>e</sup> groupe renfermant les hypertensions pulmonaires d'origine non déterminée et/ou multifactorielle complète la classification.

Classification de l'HTP	
1- Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)	
1.1.	Idiopathique
1.2.	Héréditaire
1.2.1.	Mutation BMPR2
1.2.2.	Mutations ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.2.3.	Inconnues
1.3.	Induite par des médicaments ou bien des toxines
1.4.	Associée
1.4.1.	Connectivite
1.4.2.	Infection par le VIH
1.4.3.	Hypertension portale
1.4.4.	Cardiopathie congénitale
1.4.5.	Schistosomiase
1' - Maladie veino-occlusive et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire	
1'' - HTP persistante du nouveau-né	
2- HTP due à une cardiopathie gauche	
2.1	Dysfonction systolique
2.2	Dysfonction diastolique
2.3	Valvulopathie
2.4	Congénitale/obstruction acquise des voies vasculaires d'entrée et de sortie du VG et cardiomyopathie congénitale
3- HTP due à une pathologie pulmonaire et/ou une hypoxémie	
3.1	Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)
3.2	Pneumopathie interstitielle
3.3	Autres pathologies pulmonaires restrictives et obstructives
3.4	Pathologie du sommeil
3.5	Hypoventilation pulmonaire
3.6	Exposition chronique à l'altitude
3.7	Anomalie du développement
4- HTP thromboembolique chronique (HPTEC)	
5- HTP d'origine non déterminée et/ou multifactorielle	
5.1	Trouble hématologique : anémie hémolytique chronique, syndrome myéloprolifératif, splénectomie
5.2	Troubles systémiques : Sarcoidose, hystiocytose à cellules de Langerhans pulmonaire, lymphangioléiomyomatose
5.3	Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdie
5.4	Divers : Obstruction tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique, HTP segmentaire

Tableau 2. Classification de l'HTP établie lors du cinquième World Symposium on PH, Nice 2013 [42, 44]

### 3.3 L'hypertension artérielle pulmonaire (groupe I)

Encore à ce jour incurable, il a été démontré à l'échelle internationale que la prévalence réelle de l'HTAP est probablement sous-estimée en raison de son diagnostic généralement tardif. Toutefois, celle-ci est estimée entre 15 à 50 cas pour un million d'habitants. L'incidence est de 1 à 2 cas par million d'habitants par an [45]. De plus, elle touche 1,7 femmes pour 1 homme [46].

Néanmoins, malgré des outils diagnostiques modernes, deux ans s'écoulent en moyenne entre le premier contact médical et le diagnostic. Au moment de celui-ci, 75 % des patients sont déjà en classe fonctionnelle NYHA III ou IV. Cette classification du NYHA est constituée de 4 groupes basés sur le degré d'essoufflement de l'individu (tableau 3). Puisque ce symptôme à l'effort est présent dans 95 % des cas, le classement de la dyspnée selon la classification modifiée de la NYHA permet une évaluation simple et reproductible au moment du diagnostic, mais également lors du suivi médical [47].

Les phénomènes de recrutement et de distension vasculaire sont directement responsables du délai diagnostique et de l'absence des symptômes au stade précoce de la maladie. Il est estimé que pour détecter une hausse des pressions artérielles pulmonaires au repos, le lit capillaire doit être oblitéré d'au moins 50 %. D'ailleurs, on peut observer lors d'une pneumonectomie unilatérale chez un individu sans HTP une absence d'élévation de la PAPm au niveau du poumon restant en raison de cette grande capacité de distension et de recrutement pulmonaire.

Nonobstant la présence de thérapie spécifique, le pronostic de cette maladie demeure mauvais. Dans l'étude REVEAL, les taux de survie à 1, 3, 5 et 7 ans pour toute cause d'HTP confondu se situaient à 85%, 68%, 57% et 49 % respectivement [48]. Face au pronostic sombre de



cette pathologie, on se doit de soutenir la recherche et de trouver de nouvelles méthodes diagnostiques afin d'offrir de nouveaux agents thérapeutiques qui pourront diminuer la morbidité et le taux de mortalité de cette maladie.

Classification NYHA modifiée pour L'HTP	
CLASSE I	Patients atteints d'HTP ne présentant pas de limitation de l'activité physique. Les activités physiques habituelles n'induisent pas de dyspnée ou de fatigue excessive, ni de douleur thoracique ou de sensation lipothymique.
CLASSE II	Patients atteints de l'HTP, légèrement limités dans leurs activités physiques. Ces patients ne sont pas gênés au repos. Les activités physiques habituelles induisent une dyspnée ou une fatigue excessive ou des douleurs thoraciques ou des sensations lipothymiques.
CLASSE III	Patients atteints d'HTP, très limités dans leurs activités physiques. Ces patients ne sont pas gênés au repos. Les activités physiques même légères induisent une dyspnée ou une fatigue excessive, des douleurs thoraciques ou des sensations lipothymiques.
CLASSE IV	Patients atteints d'HTP incapables de mener quelque activité physique que ce soit sans ressentir de symptômes. Ces patients ont des signes d'insuffisance cardiaque droite. Une dyspnée et/ou une fatigue peuvent être présentes même au repos. L'handicap est augmenté par n'importe quelle activité physique.

**Tableau 3. Classification fonctionnelle de la dyspnée de la NYHA modifiée par l'Organisation mondiale de la santé d'après S. Rich. Primary pulmonary, Evian : WHO 1998 [47].**

### 3.3.1 L'endothélium et remodelage vasculaire

L'endothélium, comme nous l'avons vu dans la section 2.1.5.2.3.2, joue un rôle important dans l'homéostasie vasculaire et contient les cellules les plus sensibles aux stimuli lésionnels. Selon plusieurs chercheurs, le remodelage au niveau de la paroi vasculaire à l'origine de l'HTAP serait initié par un dommage des cellules endothéliales et par une perte des connexions cellule-cellule et cellule-matrice. Ces dommages endothéliaux peuvent être occasionnés, entre autres, par un état hypoxique, des toxines, une maladie auto-immune, une mutation génétique, une altération mécanique, un stress hémodynamique, une maladie infectieuse ou bien à l'inflammation [49]. Suite à l'agression, les lésions cellulaires endothéliales entraîneront une activation de certains facteurs de transcription qui supprimeront l'expression de certaines protéines endothéliales spécifiques et augmenteront l'expression des gènes mésenchymaux [49, 50]. Par la suite, et ce de façon progressive, un changement de phénotype cellulaire s'opèrera et une prolifération aberrante des cellules endothéliales (EC) en résultera [50, 51].

Dans ce processus, l'endothélium perd alors son rôle protecteur. Il y aura une augmentation de la perméabilité des capillaires, la thrombine stimulera les plaquettes et la sécrétion de TxA<sub>2</sub>. Il y aura également une libération de certaines molécules appartenant au système du complément et des médiateurs tels TNF- $\alpha$ , PAF, PDGF et IL-1. Tout cela entraînera une élévation de l'adhésion, une hausse du recrutement des cellules pro-inflammatoires et une augmentation de l'agrégation plaquettaire. Pour ce qui est du recrutement des cellules inflammatoires, elles pourront s'activer localement et causer de nouvelles lésions tissulaires en libérant des substances cytotoxiques telles que des enzymes ou bien des radicaux libres. Elles pourront également recruter de nouvelles cellules effectrices en sécrétant des cytokines et d'autres médiateurs.

De plus, on remarque au niveau endothélial une réduction de la production de NO, une diminution de eNOS, une diminution de PGI<sub>2</sub>, une baisse de EDHF, une augmentation de TxA<sub>2</sub>, une élévation de l'endothéline, une diminution de VIP et une hausse de 5-LO [52]. Ce remodelage amorcé aura un effet délétère sur la fonction respiratoire et favorisera un environnement caractérisé par une hausse des résistances vasculaires et de l'inflammation. La thrombose in situ sera également présente [53]. L'illustration 13, une adaptation de Raja et al., démontre les différents médiateurs pouvant participer à ce remodelage vasculaire [54].

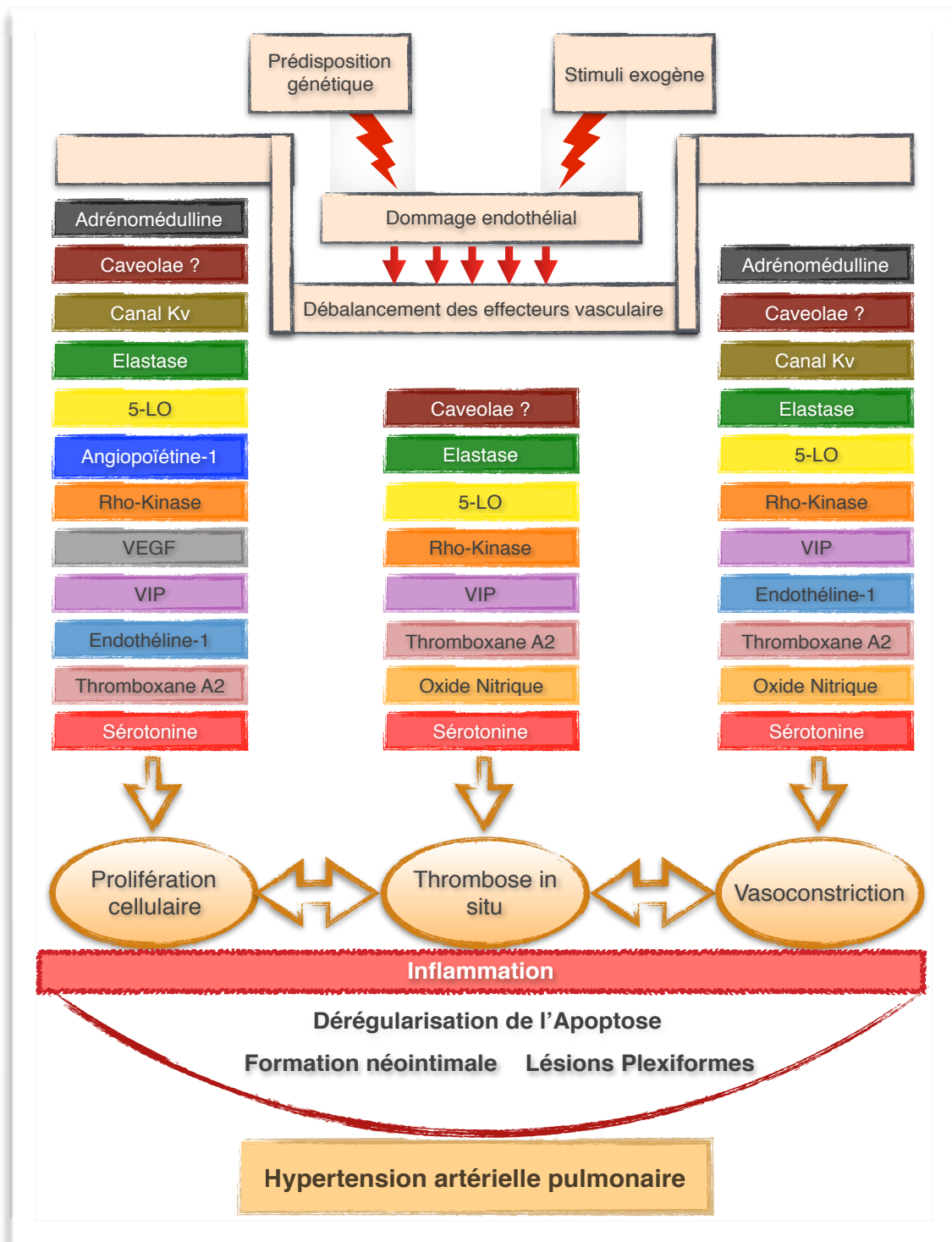


Figure 13. Pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire

L'homéostasie vasculaire est un équilibre complexe. Le dommage endothélial entraîne une dérégularisation des effecteurs du contrôle vasculaire (vasodilatation versus vasoconstriction, les suppresseurs de croissance versus les facteurs de croissance et les médiateurs prothrombotiques versus antithrombotiques). Image redessinée, modifiée et inspirée de Raja et al.[54] Reproduction autorisée.

**Info PulmoBind :** Dans les faits, nous pensons que la dysfonction endothéliale affectera l'expression du récepteur auquel le PB se lie. Par conséquent, c'est par ce moyen que nous croyons être capables de vérifier l'intégrité de l'endothélium vasculaire pulmonaire. La diminution ou l'augmentation de l'expression de ce récepteur affectera les taux de captation de notre produit et pourra fournir un signal important sur la qualité de l'intégrité endothéliale.

### 3.3.2 Caractéristiques pathophysiologiques de l'HTAP

L'HTAP peut être caractérisée par la présence de 5 atteintes structurelles ayant été décrites par Rabinovitch soit : une néo-muscularisation des petites artérioles pulmonaires distales (1), une hypertrophie de la média et de l'adventice (2), une raréfaction du lit vasculaire pulmonaire (3), la formation d'une néo intima (4) et l'apparition de lésions plexiformes (5) (figure 14) [55].

La néo-muscularisation se manifeste par la muscularisation des petites artérioles précapillaires distales qui sont normalement non muscularisées. La raréfaction des artérioles pulmonaires distales entraînera une diminution de la capacité de recrutement, une redistribution de la perfusion et une augmentation des résistances vasculaires. L'hypertrophie des vaisseaux affectera également ceux de gros calibre (100-500  $\mu\text{m}$ ) (pré-acinaire) par l'augmentation de la média ainsi que de l'adventice [56]. Cette hypertrophie causée par la hausse du nombre de cellules de type musculaire lisse provoquera un épaissement de la paroi vasculaire pour progressivement diminuer la lumière vasculaire. La formation d'une néo-intima entraînera la création d'une nouvelle couche cellulaire située entre l'endothélium et la couche limitante élastique interne. Cette dernière sera composée d'une matrice extracellulaire, de myofibroblastes, de fibroblastes et d'éléments pro-inflammatoires favorisant ainsi l'occlusion, la recanalisation des vaisseaux et la formation des lésions plexiformes. Typiquement caractéristique de l'HTAP, les lésions plexiformes sont des

anomalies complexes souvent observées à des stades avancés de la maladie. Localisées en particulier au niveau des ramifications artérielles et des artères supra-numéraires, ces lésions sont causées par une prolifération anormale des cellules endothéliales et de myofibroblastes ce qui entraîne la formation de canaux endoluminaux obstruant le lit des petites artères lobulaires. Dans la majorité des cas, elle obstrue complètement la lumière vasculaire en raison de la formation d'une matrice riche en collagène et d'un réseau de microvaisseaux aux parois fines [55]. Ces lésions microscopiques terminales se compliquent avec l'évolution de la maladie et celles-ci sont parfois associées avec des lésions interstitielles et à des lésions inflammatoires et nécrosantes des petites artères [14].

Ces caractéristiques artériopathologiques présentées ci-haut peuvent également varier en fonction de la classification clinique de l'HTP [56]. Pour simplifier la comparaison entre les différentes classes, voici un tableau sommaire regroupant les caractéristiques artériopathologiques en fonction de la classification de l'HTP (tableau 4).

**Info PulmoBind :** De façon hypothétique, la perte du lit capillaire entraînera une diminution de la captation du PB au niveau pulmonaire. De plus, on peut s'attendre à ce que le type de remodelage vasculaire présent en fonction de la nature de l'HTP vienne influencer également la distribution et le taux de captation pulmonaire du PB.

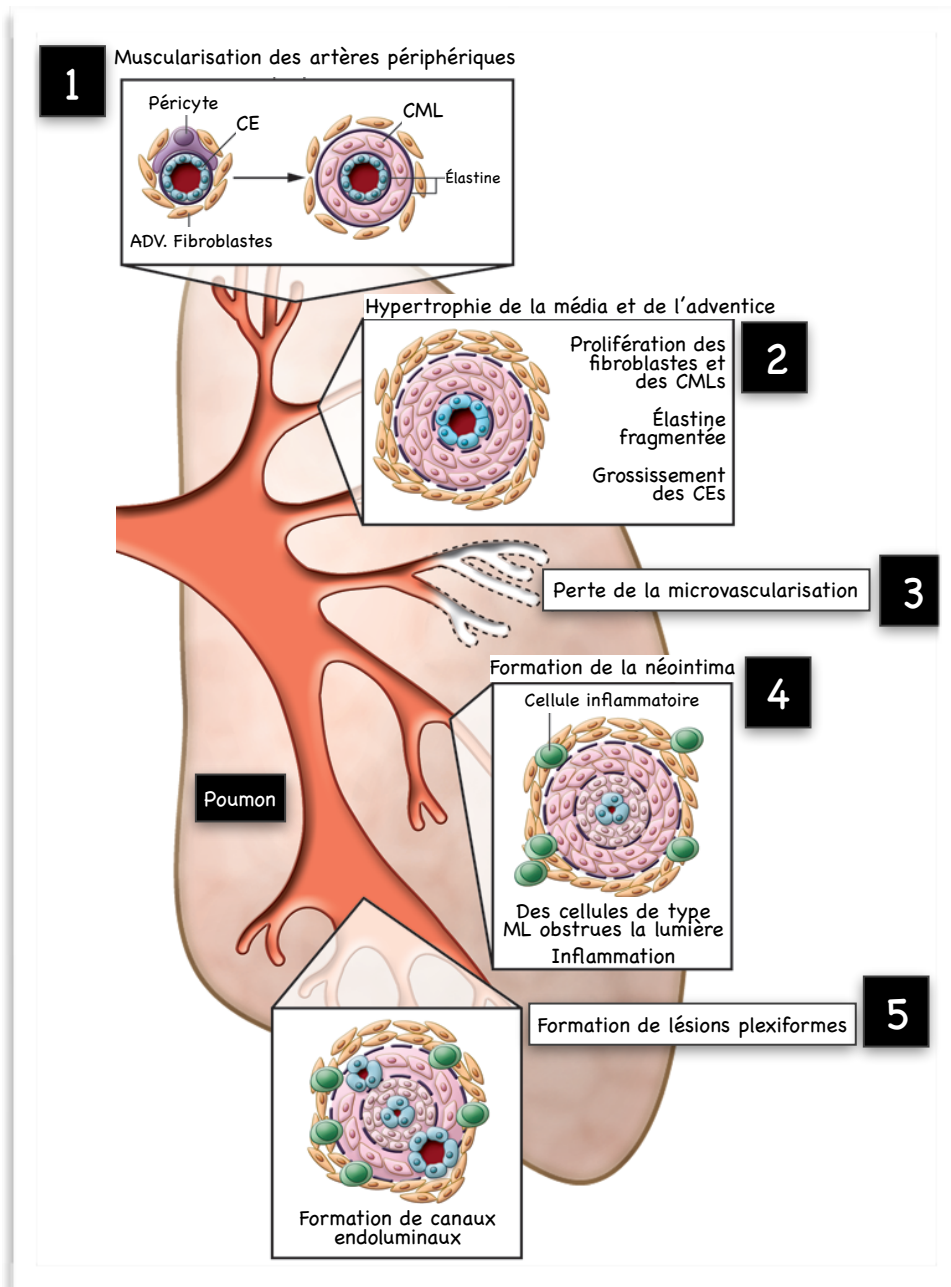




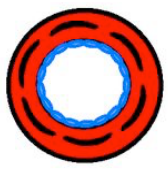


Figure 14. Artériopathie dans l'HTAP

Les 5 atteintes structurelles décrites par Rabinovitch : une néo-muscularisation des petites artérioles pulmonaires distales (1), une hypertrophie de la média et de l'adventice (2), une raréfaction du lit vasculaire pulmonaire (3), la formation d'une néo intima (4) et l'apparition de lésions plexiformes (5). Image adaptée de Rabinovitch et al. [55] Reproduction autorisée.

<h1>Artériopathie</h1>	
1- Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypertrophie de la média et de l'adventice</li> <li>• Prolifération et résistance à l'apoptose des CML</li> <li>• Vascularisation des petites artérioles</li> <li>• Prolifération cellulaire de l'intima</li> <li>• Fibrose intimale concentrique</li> <li>• Lésions plexiformes</li> <li>• Nécrose fibrinoïde</li> </ul>	
2- HTP due à une cardiopathie gauche	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypertrophie de la média</li> <li>• Muscularisation des artérioles et des veines</li> <li>• Fibrose intimale non obstructive</li> <li>• Fibrose intimale veineuse modérée</li> </ul>	
3- HTP due à une pathologie pulmonaire et/ou une hypoxémie	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les grosses artères sont généralement normales</li> <li>• Hypertrophie médiale</li> <li>• Muscularisation des artérioles</li> <li>• Changement similaire, mais à moins grande échelle au niveau des veines pulmonaires</li> <li>• Élargissement des artères bronchiques (Bronchiectasie)</li> </ul>	
4- HTP thromboembolique chronique (HPTEC)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypertrophie médiale modérée</li> <li>• Fibrose intimale excentrique</li> <li>• Recanalisation de la lumière vasculaire</li> <li>• Rare thrombus</li> </ul>	
5- HTP d'origine non déterminée et/ou multifactorielle	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muscularisation des artérioles et des veines (tumeurs)</li> <li>• Fibrose intimale non obstructive (tumeurs)</li> <li>• Granulomes vasculaires (sarcoïdose, tuberculose)</li> </ul>	

**Tableau 4. Corrélation entre la classification de l'HTP et les diverses caractéristiques du remodelage vasculaire. Tableau dessiné et inspirée de Dickinson, Wagenvoort et Mooi [56, 57]**



### **3.3.3 Les modèles animaux de l'hypertension pulmonaire**

Plusieurs modèles animaux ont été développés afin de mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques de l'HTAP. Ceux-ci s'avèrent également des outils indispensables pour l'expérimentation de nouvelles voies de traitement. De nos jours, les modèles de rats monocrotalines et de rats hypoxiques sont les plus utilisés. En plus d'être très reproductibles, ces modèles ont largement été caractérisés histopathologiquement dans la littérature. Nos connaissances sur les causes de les divers types HTP ne cessent d'augmenter et par conséquent, le développement de nouveaux modèles plus représentatifs de la physiopathologie humaine et de ces diverses formes reste d'actualité. Les nouvelles stratégies de développement de ces modèles incluent ce qu'on appelle le « multiple hit »[58]. Somme toute, ceci consiste à combiner plusieurs techniques distinctes telles que l'utilisation d'agents toxiques favorisant la surexpression ou la sous-expression de certaines voies pathologiques, l'intervention chirurgicale, la modification génétique, l'utilisation de condition hypoxique, l'usage de microsphères et bien plus. Voici la description des deux modèles animaux les plus employés.

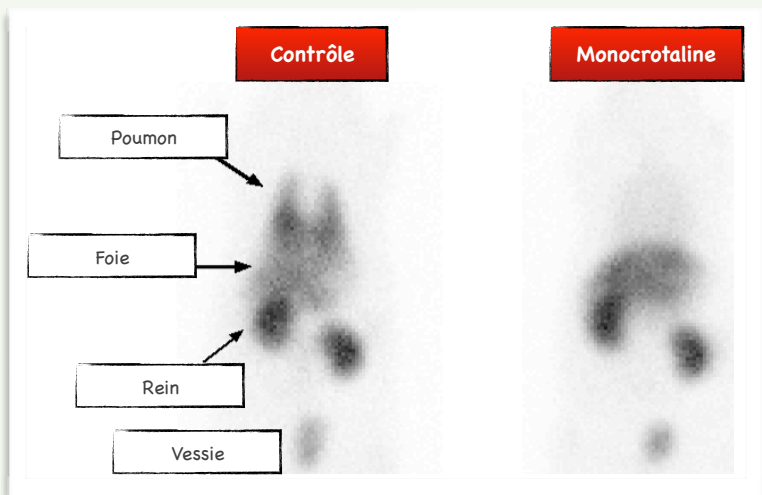
#### **3.3.3.1 Le modèle monocrotaline**

La monocrotaline est un agent toxique que nous retrouvons dans les plantes *Crotalaria spectabilis* [59]. L'administration d'une simple dose sous-cutanée ou péritonéale suffit pour obtenir un modèle d'HTAP reproductible, ce qui en fait un modèle hautement accessible. Toutefois, le dommage est très variable entre les différentes espèces en raison de la nécessité de la présence des enzymes cytochromes P450 pour obtenir le dehydromonocrotaline, sont métabolite toxique [58]. Compte tenu de sa position en aval par rapport au foie, le poumon reste l'organe le plus fortement touché. Le produit est également néphrotoxique et hépatotoxique. Le mécanisme d'action exact de la monocrotaline est encore aujourd'hui inconnu, mais il semblerait que ce soit son effet néfaste sur

l'intégrité de l'endothélium vasculaire pulmonaire qui soit la clé initiale du processus de déclenchement de la maladie. Chez le rat, il faudra environ 14 jours pour observer une augmentation de la PAPs et il s'en suivra une progression graduelle de la pathologie vers une insuffisance cardiaque droite avec un taux de survie de 35 % à 5 semaines [58]. Représentatif de la physiopathologie humaine au point de vue de la sévérité et la progression rapide, ce modèle n'exprime toutefois pas la prolifération intimale connue pour être présente chez l'humain. C'est en associant ce modèle avec une augmentation du débit pulmonaire (ex. pneumectomie ou shunt aortocave) que cette prolifération intimale sera observable [58].

### **Info PulmoBind :**

Des études in vivo dans un modèle animal de type monocrotaline ont permis d'évaluer l'efficacité du PB. Tel que noté dans l'illustration de droite, on remarque une diminution significative de la captation du PB au niveau du rat ayant reçu la monocrotaline. À la lumière de ces tests le PB semble être un agent prometteur dans le diagnostic de l'HTAP.

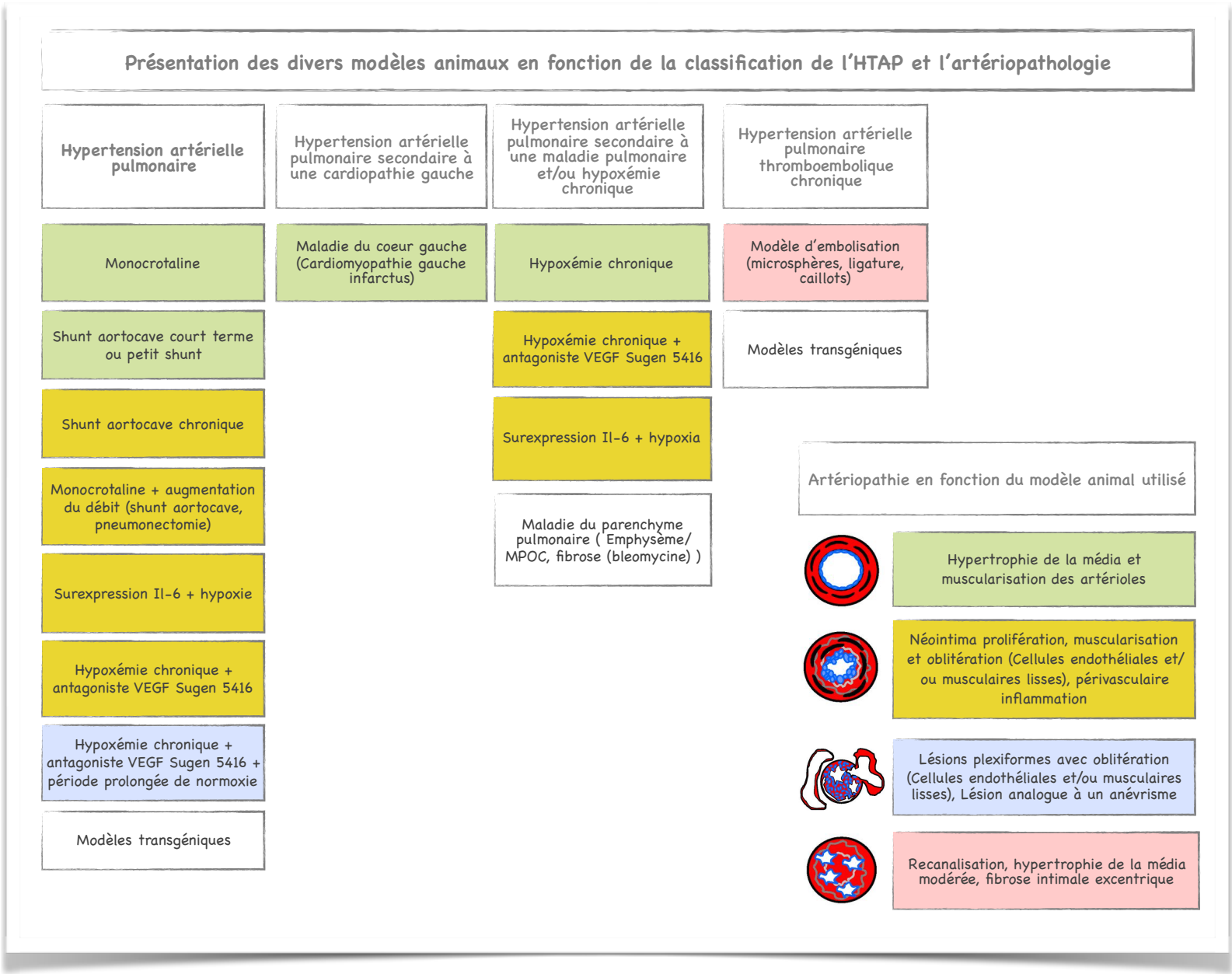


**Figure 15.** Comparaison de deux images pancorporelles d'un rat contrôle et d'un rat monocrotaline 30 minutes après injection du PB [60-62]

### 3.3.3.2 Les modèles animaux d'HTP induits par hypoxie

Il est également possible d'induire l'HTP de façon reproductible en exposant l'animal à un environnement hypoxique. Selon l'équation :  $PAO_2 = FIO_2 (Pb-47)-1,2(PaCO_2)$ , il existe deux moyens de recréer ce milieu.

Dans cette équation, la pression partielle alvéolaire en oxygène ( $PAO_2$ ) est égale à la fraction d'oxygène dans l'air inspiré ( $FIO_2$ ) multipliée par la pression barométrique ( $Pb$ ) diminuée de la pression partielle alvéolaire en eau (47 mm Hg), le tout finalement diminué de 1,2 fois la valeur de la pression partielle artérielle en  $CO_2$  ( $PaCO_2$ ). Par conséquent, pour faire varier la  $PAO_2$ , on peut soit modifier la fraction d'oxygène présente en créant un environnement 10 à 12 % d' $O_2$  par l'introduction d'azote dans une chambre normobare ou encore diminuer la  $Pb$  (-50kPa équivalents à 14 000 pieds d'altitude) à l'aide une chambre hypobare. Comparativement à la monocrotaline, ce modèle est facilement réalisable dans la quasi totalité des mammifères, mais le rat reste généralement l'espèce la plus utilisée. Ceux-ci développent après 2 à 3 semaines d'hypoxie une HTP modérée représentatif du groupe III et tout comme le modèle monocrotaline, le modèle hypoxique est caractérisé par une absence de néoprolifération intimale. Toutefois, l'administration d'un inhibiteur du VEGF en association avec une hypoxie chronique aboutit en une HTP sévère avec prolifération intimale et présence de lésions plexiformes [56]. Ce modèle est reconnu pour représenter une forme moins sévère de la maladie d'HTAP (groupe I) se rapprochant d'une classe 2 fonctionnelle (NYHA). D'autre part, ce modèle est également représentatif d'une HTP associée aux maladies pulmonaires et/ou hypoxémie chronique (groupe III). Beaucoup moins utilisé, il existe dans la littérature d'autres modèles d'HTP. Voici un résumé à la figure 16 de ces différents modèles selon la classification de l'HTP chez l'humain et l'artériopathie associée [56, 58].



**Figure 16. Classification des différents modèles animaux d'HTP à la classification de l'HTP humaine. Image redessinée, modifiée et inspirée de Dupuis et al. [58]**

### **Info PulmoBind :**

Des études in vivo dans un modèle animal hypoxie/Sugen ont permis d'évaluer l'efficacité du PB. Tel qu'illustré, on remarque une diminution significative de la captation du PB dans le groupe pathologique comparativement au contrôle. Par conséquent, encore une fois, à la lumière de ces résultats le PB semble être un agent prometteur dans le diagnostic de l'HTAP.

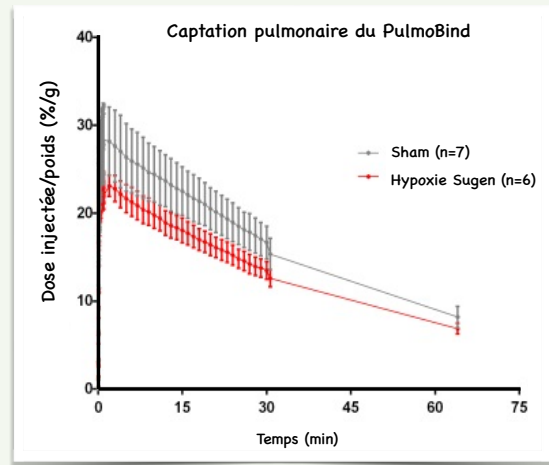


Figure 17. Captation pulmonaire du PulmoBind dans un modèle d'HTAP hypoxie/Sugen [63]

### **3.4 L'algorithme diagnostique de l'HTP**

Souvent débuté dans les phases tardives de la maladie, l'algorithme diagnostique de l'HTP propose différents tests cliniques qui permettront de diagnostiquer l'HTP, ainsi qu'en déterminer son étiologie. Or, où se situe la place d'un éventuel marqueur tel que le PB dans cet algorithme. Pour pouvoir y répondre, voici dans la figure 18 qui représente un descriptif des divers tests utilisés en centre hospitalier dans le but de diagnostiquer cette maladie.

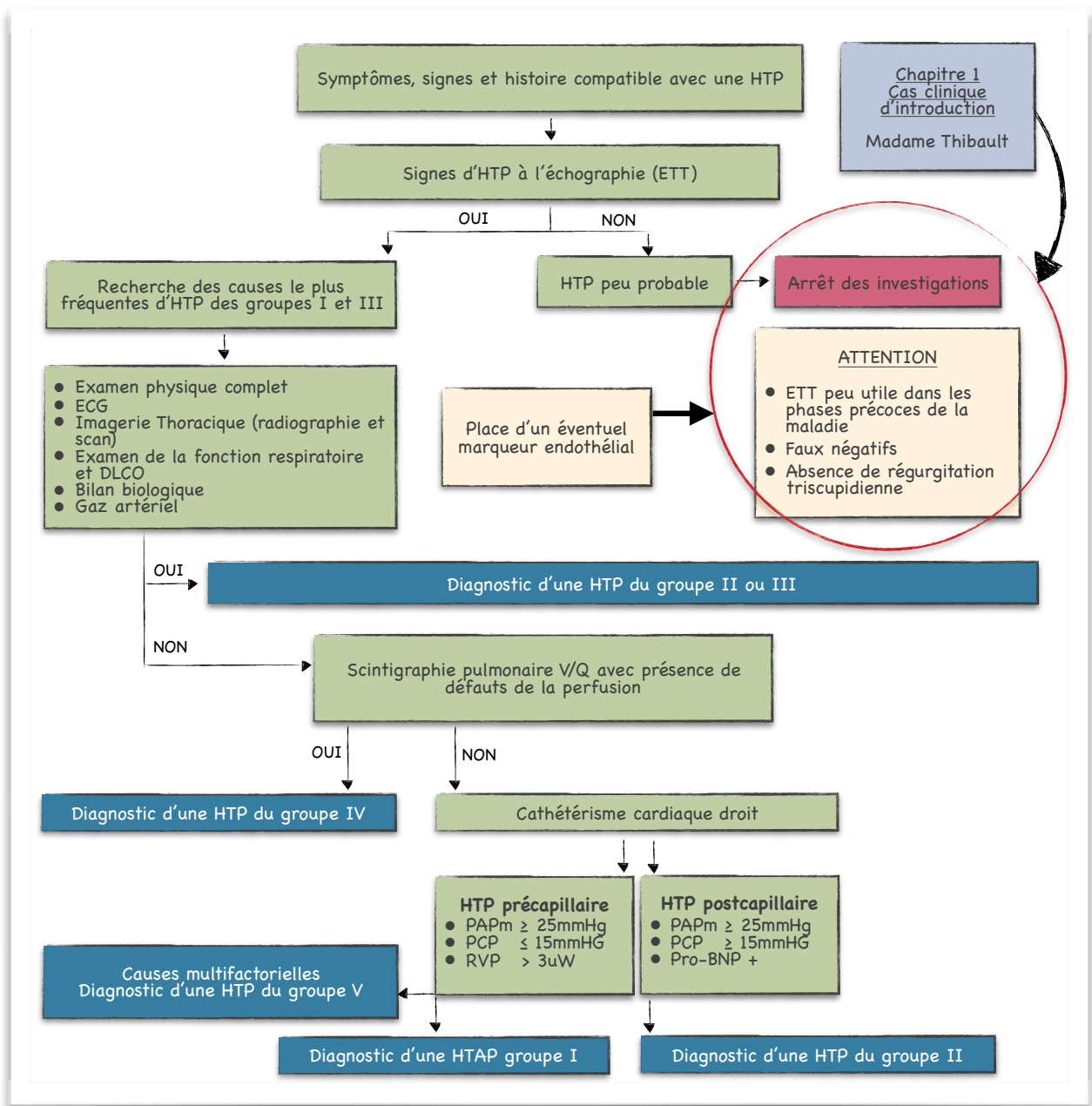


Figure 18. Arbre décisionnel pour le diagnostic d'une HTP

ECG (électrocardiogramme), DLCO (Capacité pulmonaire de diffusion du monoxyde de carbone), V/Q (ventilation/perfusion), PAPm (Pression artérielle pulmonaire moyenne), PCP (Pression capillaires pulmonaires), RVP (Résistance vasculaire pulmonaire), BNP (Peptide natriurétique cérébral). Image redessinée, modifiée et inspirée de Galie et al [64, 65]. Reproduction autorisée.

### **3.4.1.1 Les tests diagnostiques**

#### **3.4.1.1.1 La radiographie thoracique**

La radiographie thoracique est un test accessible et peu coûteux. Elle permet de rechercher des signes de l'HTP dont les suivants: la présence d'anomalies parenchymateuses et interstitielles, la présence d'une cardiomégalie ou bien l'existence d'une hypertrophie du tronc et des branches proximales des artères pulmonaires.

#### **3.4.1.1.2 L'ECG**

L'apport de l'ECG au diagnostic de l'HTP reste limité, permettant toutefois de démontrer des anomalies cardiaques telles que des signes d'hypertrophie auriculaire et ventriculaire droites.

#### **3.4.1.1.3 Échographie transthoracique**

L'échographie transthoracique (ETT) représente le test non invasif de référence dans le cadre du dépistage de l'HTP, grâce à l'évaluation de la pression artérielle pulmonaire systolique (PAPs). La mesure de ce paramètre (variable avec l'âge) est basée sur la régurgitation de la valve tricuspide (le flux d'insuffisance tricuspide (IT)).

$$\text{PAPs} = 4x (\text{VIT})^2 + \text{POD}$$

En portant la vitesse de l'IT au carré et en la multipliant par 4 et en ajoutant la pression de l'oreillette droite (OD) estimée via la tension veineuse centrale qui est représentée par les fluctuations de la veine cave inférieure, on obtient l'estimé de la PAPs. Il est important de mentionner que l'absence d'IT ne signifie pas l'absence d'HTP. Les valeurs normales de la

PAPs sont :  $\leq 35$  mmHg avant 40 ans et  $\leq 45$  mmHg après 70 ans. Pour éviter cette variabilité selon l'âge, le calcul de la PAPm est favorisé. En absence d'IT ou en cas d'IT laminaire (flux non turbulent), la PAPs peut être évaluée par le flux d'insuffisance pulmonaire (IP) ce qui permet d'estimer la pression artérielle pulmonaire diastolique (PAPd) en portant au carré la vitesse télédiastolique de l'IP + la pression de l'OD ( $IP_{\text{télé}}^2 + \text{POD}$ ).

$$\text{PAPd} = IP_{\text{télé}}^2 + \text{POD}$$

Pour sa part, la PAPm peut être calculé en portant au carré la vitesse protodiastolique de l'IP multiplié par 4 + la pression de l'OD.

$$\text{PAPm} = IP_{\text{protod}}^2 \times 4 + \text{POD}$$

La PAPs est alors calculée par la formule  $\text{PAPs} = 3\text{PAPm} - 2\text{PAPd}$ . En absence d'IT et d'IP, on peut également calculer le temps d'accélération entre le pied du flux pulmonaire et le pic. Si ce temps est  $< 100$  msec, on peut conclure à une HTP avec une sensibilité de 95 % et une spécificité de 97 %. S'il est  $> 120$  msec, ce résultat sera en faveur d'une pression normale. Ces techniques en absence d'IT sont complexes, opérateur-dépendant et nécessitent des personnes expérimentées. Cette évaluation est rarement faite lors d'une échographie de routine [66].

D'autre part, on peut affirmer que l'ETT est un examen très peu utile dans les phases précoces de la maladie. En effet, lors d'une perte inférieure à 50 % du lit capillaire pulmonaire, l'ETT au repos révèlera une PAPm probablement normale, d'où l'importance de développer des tests diagnostiques alternatifs plus précis. Par ailleurs, un autre élément à considérer est évidemment l'échogénicité transthoracique. Effectivement, certaines personnes



auront une mauvaise échogénicité ce qui rendra l'examen plus difficile et part le fait même les données estimées qui en découleront s'avèreront moins représentatives de la réalité.

Une fois le diagnostic confirmé par cathétérisme, l'ETT pourra aider dans le suivi de la progression. Il permettra également d'évaluer l'état fonctionnel cardiaque dont les résultats seront étroitement reliés au pronostic de la maladie. Ceci se fera par l'obtention de certains paramètres tels que la TAPSE, les dimensions cardiaques, la fraction d'éjection des ventricules gauche (VG) et droit (VD) et l'indice de la fonction systolo-diastolique (Tei) [66].

#### **3.4.1.1.3.1 Sensibilité et spécificité de ETT**

Une importante étude monocentrique comparative entre l'ETT et le cathétérisme cardiaque a été effectuée sur plus de 2119 patients en 2014 par le chercheur Sebastian Greiner et son équipe de l'Université de Heidelberg (Allemagne) [67]. De ces 2119 patients, 424 (20%) ont dû être retirés en raison de l'absence de régurgitation tricuspidienne lors de l'ETT. De ce nombre, 227 (54%) ont reçu un diagnostic positif d'HTP à la suite du cathétérisme cardiaque confirmant ainsi que l'absence de régurgitation n'exclue pas la présence de l'HTP. D'autre part, pour ce qui est des 1695 patients dont la régurgitation était visible voici un tableau sommaire des résultats de la sensibilité et de la spécificité ayant été déterminés lors de l'analyse statistique.

Valeurs seuils PAPs (mmHG)	Sensibilité (%)	Faux négatifs (n)/1221	Faux positifs (n)/1221	Spécificité (%)
≥ 26	98,5	19	683	28,7
≥ 31	94,6	66	199	58,0
≥ 36	87	182	73	79,1
≥ 41	73,1	449	26	91,4
≥ 46	59,5	831	9	97,0

**Tableau 5. Tableau de la sensibilité et la spécificité de l'échographie transthoracique dans le diagnostic de l'hypertension pulmonaire lors de l'étude de Greiner et al.**

D'autres études et méta-analyses ont été publiées telles que : Fisher et al. (n=65) [68], Rich et al. (n=183) [69], D'Alto et al. (n=152) [70], Zhan et al. n=736 (6 études) [71], Janda et al. n=1485 (29 études) [72] et Taleb et al. n=522 (9 études) [73]. Les conclusions de ces études sont variables. Deux d'entre eux déconseillent tout simplement l'utilisation de l'ETT dans le diagnostic de l'HTP en raison du manque de précision. Toutefois, en général, on estime que l'ETT est un bon test non invasif utile qui possède cependant plusieurs limitations. Malheureusement, en raison de la variabilité des valeurs obtenues de la PAP en ETT, de l'absence parfois de l'IT et de la présence non négligeable de faux négatifs et de faux positifs dans la détection de l'HTP, le cathétérisme cardiaque droit reste le seul test permettant d'affirmer le diagnostic de l'HTP. Néanmoins, ni l'un ni l'autre de ces examens ne permettent de diagnostiquer les stades précoces de la maladie.

#### **3.4.1.1.4 Le cathétérisme cardiaque droit**

Le cathétérisme cardiaque droit est un test invasif pouvant être effectué que par des spécialistes hémodynamiciens lorsqu'une HTP est suspectée. Cette technique consiste à

introduire un cathéter de type Swan-Ganz dans l'artère pulmonaire dans le but de calculer de façon directe et précise divers paramètres. Ceux-ci permettront dans un premier temps de confirmer le diagnostic de l'HTP et dans un deuxième temps de déterminer l'étiologie de la maladie.

La pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) (Wedge) informera sur l'origine précapillaire ( $PCP \leq 15$  mmHg) ou post capillaire ( $PCP > 15$  mmHg) de l'hypertension. Le Swan-Ganz permettra également d'évaluer les résistances vasculaires pulmonaires. Par conséquent, une résistance de plus de  $3uW$  coïncide avec la présence d'une HTP. D'autre part, cette technique sera aussi utilisée dans les tests de vasoréactivité pulmonaire, généralement au moyen du monoxyde d'azote par inhalation et au moyen de l'époprostenol, l'iloprost ou bien l'adenosine intra-veineux [74, 75]. Ceci a pour but de déterminer la susceptibilité du patient à répondre efficacement à un traitement basé sur des inhibiteurs calciques [75].

#### **3.4.1.1.5 Les épreuves fonctionnelles respiratoires**

Les tests de la fonction respiratoire sont indispensables dans la recherche de maladies pulmonaires restrictives ou obstructives associées. Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) usuelles comprennent 3 examens standards : la spirométrie, la mesure des volumes pulmonaires et la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO).

##### **3.4.1.1.5.1 La spirométrie**

Malgré ses limites, la spirométrie est considérée comme étant le meilleur test de caractérisation de l'état de santé pulmonaire. Ce test consiste à déterminer au cours d'une expiration forcée, le volume expiré maximal en une seconde (VEMS, ou en anglais  $FEV_1$ ), la

capacité vitale forcée (CVF, ou FVC), le débit expiratoire de pointe (DEP, ou PEF), le débit expiratoire maximal entre 25-75 % de la CVF (DEM<sub>25-75</sub> ou la FEF<sub>25-75</sub>) et finalement la capacité vitale (CV, ou VC) au cours d'une expiration lente [76]. Le trouble ventilatoire obstructif (TVO) (ex : asthme, MPOC) résulte d'une réduction disproportionnée du débit expiratoire maximal par rapport au volume maximal (CV) qui lui reste inchangé. Par conséquent, les TVO peuvent être observables au moment d'un abaissement du rapport VEMS/CVF et lors d'une réduction du DEP. On verra également le VEMS diminué dans le trouble de ventilation restrictif (TVR) (ex : pneumopathies interstitielles, résection pulmonaire) qui sera accompagné d'une baisse des volumes pulmonaires et d'une diminution de la CV et la CPT [76]. Toutefois, le rapport VEMS/CVF restera dans les valeurs normales. La présence d'une maladie respiratoire restrictive ou obstructive associée à une hypoxémie permettra d'orienter le diagnostic vers une HTP de groupe III. Il est important de noter qu'un test de spirométrie normal n'exclue pas en aucun temps la présence potentielle d'une HTP.

#### **3.4.1.1.5.2 La mesure des volumes pulmonaires**

Alors que la spirométrie mesure le volume d'air mobilisable entre l'inspiration maximale et l'expiration maximale, l'analyse précise des volumes pulmonaires est possible grâce à la méthode de dilution des gaz par la pléthysmographie corporelle. L'exploration des volumes pulmonaires est en particulier indiquée lorsqu'il a un abaissement de la CV à la spirométrie pouvant être le reflet d'un TVR ou d'un piégeage gazeux [77]. Pour ce qui est de l'HTP de groupe I, II, IV et V, les mesures des volumes et des débits pulmonaires sont généralement normales. Toutefois, certaines études démontrent que dans la plupart des cas, un déficit ventilatoire restrictif discret à modéré est observé, mais celui-ci ne corrèle pas avec la

classe fonctionnelle NYHA. Ce portrait d'un TVR est explicable en raison des diverses modifications des structures pulmonaires impliquées dans la pathologie de l'HTP. De ce fait, trois facteurs peuvent être à la source de ces changements : la cardiomégalie, le remaniement des vaisseaux et la dysfonction des muscles respiratoires.

#### **3.4.1.1.5.3 Capacité de diffusion du monoxyde de carbone**

La diffusion pulmonaire au monoxyde de carbone (DLCO : Diffusing Capacity of the Lung for Carbon Monoxide) est un test au repos utilisé en clinique pour caractériser la qualité des échanges gazeux entre les alvéoles et le compartiment sanguin. Un sujet sain présente des valeurs de DLCO entre 75 et 125 % des valeurs prédites pour l'âge, la taille et le sexe [77] [78].

Une faible diffusion peut être associée entre autres à une anémie, une perte de la surface alvéolaire (emphysème), un épaissement de la membrane alvéolo-capillaire (œdème pulmonaire, maladies interstitielles) ou dans le cas de l'HTAP à une diminution du lit capillaire [79]. La baisse enregistrée de la DLCO dans l'HTP pourra être objectivée dès le tout début de la maladie, mais sera plus prononcée quand celle-ci sera associée aux connectivites et aux pneumopathies interstitielles. Il est également important de noter que la DLCO représente un bon facteur pronostique permettant de suivre l'évolution de la maladie [77]. De plus, tout comme la spirométrie, il faut souligner que l'obtention d'une valeur normale de la DLCO n'exclue pas la présence d'une HTP.

### 3.4.1.1.5.4 Bilan et analyses sanguines

Des examens sanguins peuvent être également utiles dans l'investigation initiale de la maladie dans le but de définir son étiologie. Toutefois, un bilan de laboratoire normal n'exclut pas une HTP. Ci-joint tableau résumé de ces bilans ainsi que les conditions recherchées.

Bilans et analyses sanguins	
Analyses	Conditions recherchées
Formule sanguine	Anémie, syndrome myéloprolifératif, polycythémie
Coagulogramme (PT/PTT/D-dimère/fibrinogène)	Coagulopathie, cirrhose, thrombus
Bilan hépatique	Hépatite, cirrhose
Bilan thyroïdien (TSH, T4 et T3)	Maladie thyroïdienne
Anticorps antinucléaire anti-centromère ANTI-ENA (anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA, anti-SSB, anti-JO1, anti-Scl70, anti-CENP-B)	Connectivite
Sérologie VIH, hépatite B et C	Séropositivité, hépatite
Gaz artériel	Hypoxémie, acidose
Pro-BNP	Surcharge, insuffisance cardiaque
Haptoglobine	Hémolyse, connectivites, collagénose, hépatite

Tableau 6. Tableau des diverses analyses et bilans sanguins pouvant être effectués dans l'optique de déterminer l'étiologie de la maladie. Tableau redessiné, modifié et inspiré de [65, 80]

### 3.4.1.1.6 L'imagerie de la perfusion pulmonaire

Avec les années, l'imagerie médicale est devenue un élément essentiel afin de permettre la prestation de soin dans le domaine de la santé. Elle consiste en un moyen efficace, rapide et non invasif permettant d'appuyer le diagnostic médical. Elle se base sur différents phénomènes physiques tels que l'absorption des rayons X, la résonance magnétique et la radioactivité. En 2012, les Canadiens ont subi plus de 1,7 million d'examen d'imagerie par

résonance magnétique (IRM) et 4,4 millions d'examens de tomodensitométrie (TDM) [81]. Il s'agit de près du double du nombre d'examens effectués en 2003, ce qui peut être expliqué par la modernisation des infrastructures hospitalières et l'augmentation de l'offre. Pour ce qui est de la médecine nucléaire, la quantité d'actes est estimée chaque année au Canada à 1,5 million, dont plus de 80 % dépendent de produits radiopharmaceutiques marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ . Malgré la présence de plusieurs méthodes d'acquisitions bien établies, de plus en plus de recherches se font dans le domaine de l'imagerie de nos jours.

Il est actuellement possible d'imager la perfusion pulmonaire à l'aide de diverses techniques telles que l'imagerie par IRM, la TDM, la tomographie par émission de positrons (TEP) et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP). Il est essentiel de spécifier que ces techniques possèdent d'importantes différences, tant au niveau de l'irradiation totale émise, de la résolution et des types de contrastes ou traceurs utilisés.

Il faut également discerner les méthodes d'analyse qualitative, semi-quantitative et quantitative. La méthode qualitative se base sur l'interprétation et l'observation visuelle humaine d'un cliché. Dans cette situation, le spécialiste associe un aspect d'imagerie avec la séméiologie d'une pathologie. C'est par exemple le cas d'un radiologiste qui va suspecter la présence d'une HTP au TDM suite à la visualisation d'une dilatation des structures artérielles, d'une dilatation du cœur droit, d'une vascularisation systémique collatérale, d'une obstruction artérielle ou des séquelles d'un infarctus du tissu pulmonaire.

La méthode semi-quantitative consiste en une analyse impliquant des indices et/ou des ratios comme : le ratio ventilation et perfusion, l'aire sous la courbe (AUC), la concentration maximale ( $C_{\text{max}}$ ) ou bien par exemple le temps nécessaire pour atteindre le  $C_{\text{max}}$  ( $T_{\text{max}}$ ).

**Info PulmoBind :** L'imagerie obtenue avec le PB est dite semi-quantitative. En effet, l'analyse des clichés se basera sur des ratios tels que : le pic de captation pulmonaire et l'AUC entre autres.

Finalement, la méthode quantitative est une approche plus robuste et complexe qui emploie des techniques et des modèles mathématiques beaucoup plus poussés. Celle-ci prendra en compte la concentration réelle de l'agent, le type de tissu, la catégorie de technologie utilisée, la nature du radiopharmaceutique et bien plus. Seules deux méthodes d'acquisition permettent de l'obtenir soit: la scintigraphie de perfusion avec échantillonnage artériel et correction de l'atténuation tissulaire et la TEP qui permet une mesure absolue du flux sanguin grâce à des radiotraceurs qui émettent des positrons.

L'imagerie pulmonaire n'est pas si simple à réaliser et amène un lot important de facteurs complexes. Entre autres, la perfusion et la structure pulmonaire sont facilement affectées par le mouvement respiratoire. Par conséquent, on observe que la perfusion pulmonaire peut plus que doubler en période d'expiration lorsque comparée à l'inspiration, ce qui peut introduire des biais quantitatifs. Les examens se faisant sur une plage de temps de plusieurs minutes (IRM, TEP, TEMP), il est alors impossible pour le patient de maintenir une apnée pendant une aussi longue période.

#### **3.4.1.1.6.1 Tomodensitométrie (TDM)**

Introduit en clinique dans le début des années 1990 par Miles et al, l'angioscan pulmonaire est un examen fortement utilisé de nos jours pour évaluer la perfusion afin d'évaluer la présence ou non d'une embolie pulmonaire [82]. Son principe consiste à obtenir à



l'aide de rayons X et d'un produit de contraste iodé des images en coupes fines des artères et des structures pulmonaires dans le but de déterminer la présence d'un déficit perfusionnel. Cet examen qui fait compétition à la scintigraphie pulmonaire aux macroagrégats d'albumine (MAAs) s'est montré aussi efficace que celle-ci lors d'études comparatives [83, 84]. Par contre, grâce à la TDM, il est faisable d'effectuer une analyse structurelle des composantes thoraciques dans le but d'y découvrir des anomalies associées à l'HTP. Parmi ceux-ci on compte une dilatation du ventricule droit et une dilatation du diamètre des artères pulmonaires, des branches segmentaires et des artères bronchiques. Il sera également possible d'observer une réduction rapide du calibre des artères et une dilation/hypertrophie des ventricules droit et/ou gauche.

D'autre part, lorsque comparé à l'IRM un des avantages importants de la TDM est la relation simple qu'il existe entre la densité d'un pixel et le coefficient d'atténuation des différents tissus qui le compose ainsi que la relation linéaire entre la prise de contraste et la quantité d'iode absorbée par le tissu étudié.

#### **3.4.1.1.6.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM)**

L'IRM occupe actuellement une place de plus en plus prépondérante au sein des techniques d'exploration thoracique. Comparativement aux autres organes, l'IRM des poumons est relativement récente. La faible diversité de protons au niveau du parenchyme pulmonaire, les mouvements cardiaques et respiratoires et les artéfacts générés par l'interface entre l'air et les tissus représentent un ensemble d'éléments rendant l'IRM pulmonaire difficile d'interprétation. Malgré ces obstacles, il existe deux principales méthodes d'IRM pour évaluer la perfusion pulmonaire. La première étant une technique utilisant un agent de contraste

exogène soit le gadolinium et la deuxième une méthode ayant recours à un agent de contraste endogène l' « Arterial spin labelling » (ASL) [85] .

Le gadolinium permet lors de son premier passage une analyse perfusionnelle de la macro et la microcirculation pulmonaire. Il est également possible avec différents réglages d'estimer la vitesse circulatoire, le débit cardiaque, les pressions artérielles pulmonaires et les résistances pulmonaires. Cette technique est très prometteuse dans le diagnostic de l'HTP, d'autant plus qu'elle est plus reproductible et précise que l'échographie cardiaque.

La deuxième méthode d'IRM est l'ASL. Celle-ci est utilisée dans l'imagerie de la perfusion pulmonaire, et ce sans agent de contraste exogène. Cette procédure peut être avantageuse chez les patients avec insuffisance rénale ou immuno-sensibles aux agents de contrastes. Le principe de ce mode d'acquisition permet de magnétiser le sang et à l'utiliser comme traceur de la perfusion. Cette technique offre également la possibilité de faire de multiples clichés successifs en toute sécurité. Cependant, elle est considérée de moins bonne qualité que les autres méthodes classiques en raison du rapport signal sur bruit.

### **3.4.1.1.6.3 L'angiographie pulmonaire**

L'angiographie pulmonaire est aujourd'hui remplacée par des examens beaucoup moins invasifs pour le diagnostic d'embolie. Cet examen consiste en un cathétérisme par la veine antébrachiale ou fémorale qui permettra d'évaluer suite à l'injection d'un produit de contraste iodé la qualité de la perfusion pulmonaire. Même si la mortalité associée à cette procédure est faible, la présence de complications existe dans 1 à 5 % des cas (insuffisance rénale, troubles du rythme). Cette technique est alors utilisée en dernier recours. Il est également important de préciser que l'expertise professionnelle pour ce genre d'intervention se fait rare.

### **3.4.1.1.6.4 Imagerie par impédance électrique**

La tomographie d'impédance électrique (TIE) est une technique d'imagerie fonctionnelle qui permet d'obtenir des images de la distribution spatio-temporelle des propriétés électriques résistives d'une région corporelle. Au niveau des poumons, la variation de l'impédance pourra s'effectuer au moment d'un changement physiologique et/ou pathologique. Par conséquent, elle variera lors d'un œdème pulmonaire, d'une fluctuation du volume sanguin, d'une fibrose, d'un pneumothorax ou bien d'un emphysème. Elle sera également influencée par des facteurs physiologiques comme la ventilation, la perfusion et la fréquence cardiaque. La TIE possède comme avantage d'être une technique non invasive que l'on peut utiliser à long terme et en continu tout en étant très sécuritaire pour le patient [86]. De plus, ces systèmes (Ex. DRÄGER PULMOVISTA® 500) sont compacts et peu coûteux à l'achat et en frais d'exploitation. Pour l'instant en clinique, ceux-ci sont principalement utilisés en post opératoire et aux soins intensifs pour améliorer le suivi médical. Toutefois, cette méthode possède plusieurs limitations en commençant par sa pauvre résolution spatiale,

et ce en comparaison avec les autres techniques d'imagerie (de l'ordre de 10 à 20 cm<sup>3</sup>). D'autre part, il est possible d'explorer qu'une seule coupe tomographique (5 cm) à la fois [87]. Cette faible résolution spatiale est cependant contrebalancée par une résolution temporelle élevée de 0,08 seconde [87]. La TIE permet uniquement de visualiser les plages présentant un changement. Par conséquent une zone pulmonaire atelectasiée préexistante avant l'examen ne sera pas visible sur l'image reconstituée. Seule, la TIE semble très peu avantageuse. Toutefois, des études expérimentales ont démontré que l'association de cette technique avec d'autres types d'imageries comme moyen de correction du mouvement respiratoire et cardiaque a permis d'obtenir des résultats prometteurs [88]. Il est important de mentionner que ce type d'imagerie par impédance est très peu disponible et très peu utilisée en milieu hospitalier de nos jours. Cette réalité changera probablement dans un futur rapproché en raison de l'ensemble des efforts précliniques qui sont présentement investis en recherche et développement.

#### **3.4.1.1.6.5 Imagerie en médecine nucléaire**

Il existe actuellement deux techniques d'imagerie scintigraphique utilisant des caméras gammas : la TEMP basée sur l'émission de photons (tomographie d'émission monophotonique), dite aussi SPECT (de l'anglais Single photon emission computed tomography) et le TEP basée sur l'émission de positrons (tomographie par émission de positrons), dite aussi PET (de l'anglais positron emission tomography).

**Info PulmoBind :** Le PulmoBind est capable de se lier au  $^{99m}\text{Tc}$ . Cette caractéristique en fait de lui un radiotraceur pour l'imagerie TEMP. La section suivante permettra de mieux connaître cette technologie et les fondements de la physique nucléaire qui la compose.

#### 3.4.1.1.6.5.1 Tomographie d'émission monophotonique

La tomographie d'émission monophotonique (TEMP) ou Single Photon Emission Computed Tomography a été pensée et créée dans les années 1960 par David Khul et al [82]. Toutefois ce n'est qu'à la fin des années 1980 que cette technique fit son apparition en clinique [82]. Cette modalité d'imagerie consiste à étudier la biodistribution spatiale d'une substance radiopharmaceutique grâce à la détection des photons ( $\gamma$ ) émis dont l'énergie peut varier de 70 à 370 keV [89]. Ce rayonnement  $\gamma$  sera donc enregistré sous différents angles à l'aide d'une caméra à scintillation possédant une à plusieurs têtes de détection. La reconstruction de l'image 3D se fera par l'analyse des diverses projections obtenues lors de l'examen. Contrairement à la radiologie diagnostique qui évalue principalement l'anatomie des organes ou des tissus par transmission, la médecine nucléaire permet l'évaluation fonctionnelle et métabolique d'une structure par imagerie d'émission.

Au niveau pulmonaire, des agents particuliers et non particuliers ont été étudiés et utilisés pour mesurer la perfusion tissulaire. Certains agents non particuliers pouvant traverser la barrière hématoalvéolaire tout comme le dioxyde de carbone radiomarqué ( $\text{C}_{15}\text{O}_2$ ) ont été initialement employés par inhalation en association avec des sondes externes scintigraphiques dans le but de révéler de façon approximative la perfusion pulmonaire

régionale [42]. Le  $^{133}\text{Xenon}$  principalement utilisé pour la quantification de la perfusion cérébrale, a également été employé au niveau pulmonaire par la dissolution de celui-ci dans une solution saline physiologique pour injection intraveineuse. Toutefois, ce n'est qu'avec l'arrivée de la caméra Angers dans les années 50 qui a été possible d'introduire l'imagerie planaire permettant de révéler sous son vrai jour la distribution de la perfusion pulmonaire [90].

Historiquement, les toutes premières particules employées pour évaluer la présence d'embolie pulmonaire étaient des particules de carbone d'environ 50  $\mu\text{m}$  marquées à l'or radioactif (Au-198) ou bien des particules de céramique marquées à l'argent (Ag-211) ou au mercure (Hg-203) [42]. La nécessité d'utiliser des microparticules biodégradables pour la réalisation d'un acte diagnostique chez l'homme va orienter les travaux de Taplin *et al.* qui publieront, dès 1964, leurs premiers résultats concernant l'utilisation de macroagrégats d'albumine (MAAs) [82].

Les MAAs représentent un produit biologique dérivé de l'albumine sérique humaine. Compte tenu de leur taille (10 à 100  $\mu\text{m}$ ), ceux-ci seront capturés dans la vascularisation pulmonaire [2]. Cette microembolisation bloquera ainsi environ 0,1 % du lit capillaire. Pour cette raison, il n'est pas conseillé d'administrer ceux-ci aux patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire sévère ou possédant un shunt cardiaque. Cependant, un des avantages des MAAs est que 95 % de la dose injectée en moyenne se retrouve aux poumons provoquant l'analyse d'une seule région d'intérêt représentant quasi 100 % de la dose injectée. Les embolies seront identifiées par la présence de zones hyporadioactives. Les MAAs sont aujourd'hui un des radiopharmaceutiques les plus couramment employés en clinique après

leur marquage au  $^{99m}\text{Tc}$  Technetium ou à l' $^{113m}\text{In}$  Indium. Certains groupes ont également utilisé le Krypton 81 métastable ( $^{81m}\text{Kr}$ ) [2, 42]. Cet isotope du krypton possède une demi-vie radioactive très courte (13 secondes) et exige donc une perfusion continue afin de créer des clichés scintigraphiques.

La raison de la popularité des MAAs réside au niveau de leurs demi-vies biologiques qui est supérieure aux radiopharmaceutiques non particulaires. Cet avantage permet l'acquisition 3D par TEMP. L'imagerie aux MAAs est non quantitative et est dite structurelle puisqu'elle se base sur des principes physiques et non métaboliques pour générer les images.

Par la technologie TEMP et pour aider au diagnostic, il est également possible d'étudier la ventilation. Dans le cas où une zone est non perfusée, mais ventilée, un diagnostic d'embolie pulmonaire sera confirmé. Pour ce faire, le Xénon-133 est le premier gaz radioactif à avoir été utilisé comme traceur dès la fin des années 1960 [82]. Dans les années 75, en raison des problèmes de radioprotection du Xénon-133, c'est le  $^{81m}\text{Kr}$  qui a fait ses débuts dans les études de la ventilation. Sa faible dosimétrie permettait la réalisation de nombreuses incidences successives tout en étant sécuritaire pour le patient et le personnel.

Pour des questions de coût et de facilité de manipulation, les aérosols représentent actuellement les radiotraceurs les plus utilisés. Ceux-ci sont constitués soit de particules liquides ou solides radiomarquées en suspension dans un flux d'air. Tout comme le  $^{81m}\text{Kr}$ , ces aérosols permettent une acquisition tomographique. Cependant, le  $^{81m}\text{Kr}$  possède un avantage indéniable au niveau de la dosimétrie du patient et de la radioprotection. De plus, puisque le  $^{81m}\text{Kr}$  est un gaz, on ne visualise donc pas de dépôts bronchiques à l'imagerie [2]. Néanmoins,

ce radiopharmaceutique a été très peu utilisé en raison des coûts associés élevés et par le fait même sa disponibilité est demeurée marginale.

La scintigraphie pulmonaire de ventilation/perfusion est un test qui est fait systématiquement dans l'investigation d'une HTP, et ce dans le but d'éliminer une maladie thromboembolique chronique. Lors de cet examen, la présence de défauts de perfusion systématisés et segmentaires non concordants en ventilation pourra orienter le diagnostic vers une HTP de groupe IV.

### **3.4.2 Tomographie par émission de positrons (TEP)**

Cette technique d'imagerie se base sur l'utilisation de radioisotopes émetteurs de positrons qui après annihilation produiront l'émission de deux photons de 511 keV d'énergie dans des directions diamétralement opposées. Malgré sa résolution spatiale limitée, mais toutefois supérieure au TEMP, sa grande originalité réside dans son pouvoir d'effectuer de façon peu invasive une étude fonctionnelle régionale, tridimensionnelle et quantitative [2]. Les radionucléides les plus utilisés en TEP pour l'évaluation de la perfusion pulmonaire sont :  $^{13}\text{N}_2$  (inhalation) et le  $\text{H}_2^{15}\text{O}$  (injection IV). De plus, il est aussi possible de marquer les MAAs avec le Gallium-68, et ce dans le but de vérifier en TEP la présence d'embolies pulmonaires [91].

Dans un temps d'acquisition plus court, les images obtenues avec le Gallium-68 seront de qualité supérieure lorsque comparées à la TEMP avec Technétium-99m. Toutefois, ce type d'acquisition ne possède pas uniquement des avantages, mais aussi des inconvénients. De ceux-ci nous pouvons relever entre autres son coût d'utilisation ainsi que la nécessité d'avoir accès à un cyclotron à proximité (sauf le gallium-68 produit par un générateur) en raison de la très courte demi-vie de la plupart des isotopes émetteurs de positrons (Tableau 7) [89].



	Demi-vie	Production
Carbone-11	20,4 minutes	Cyclotron
Azote-13	9,96 minutes	Cyclotron
Oxygène-15	2,04 minutes	Cyclotron
Fluor-18	109,7 minutes	Cyclotron
Cuivre-62	9,74 minutes	Générateur
Cuivre-64	12,7 heures	Cyclotron
Gallium-68	68,1 minutes	Générateur
Brome-76	16,1 heures	Cyclotron
Iode-124	4,17 jours	Cyclotron

**Tableau 7. Principaux isotopes utilisés en TEP, leur demi-vie et leur mode de production. Tableau redessiné, modifié et inspiré de [89]**

**Info PulmoBind :** Des études sont présentement en cours afin de permettre le marquage du PB avec le fluor-18. Ce nouveau radiopharmaceutique pourra alors être utilisé en imagerie TEP.

### 3.5 Évolution technologique en médecine nucléaire

Une des évolutions importantes dans le monde de l'imagerie nucléaire dans les dernières décennies est sans aucun doute le développement des caméras hybrides TEMP-TDM, TEP-TDM, TEMP-IRM et TEP-IRM. La fusion de ces technologies au sein d'un même appareillage a permis l'obtention d'une acquisition fonctionnelle (TEMP) (TEP) et morphologique (TDM) (IRM) de façon successive sans changer la position du patient. Par cette technique on note une amélioration de la sensibilité, de la spécificité et de la qualité des images en raison de la correction de l'atténuation (TDM seulement), de la compensation de l'effet de volume partiel (TDM-IRM) et par l'augmentation de la facilité de la segmentation des structures (TDM-IRM).

Dans le domaine respiratoire, il n'y a pas eu de grande révolution durant les dernières décennies en ce qui a trait aux radiopharmaceutiques. Néanmoins, il existe dans la littérature des travaux faisant la démonstration de l'efficacité de certains radiotraceurs expérimentaux. Chacun d'entre eux se basent sur les propriétés métaboliques endothéliales du poumon (Section 2.1.5.2.3.2) pour imager celle-ci. Ceux-ci ciblent alors des récepteurs, des transporteurs ou des protéines présents à la surface de l'endothélium pulmonaire. Très peu ont cependant été testés sur des sujets humains. Le tableau 8 est une liste résumée des différents radiopharmaceutiques ainsi que leurs cibles associées.

Le potentiel de l'imagerie nucléaire dans le diagnostic médical est vaste. Pour cette raison, notre laboratoire a cru bon de cibler cette technologie d'acquisition dans le but d'offrir un test innovateur permettant le diagnostic précoce et le suivi de l'HTAP.

Cibles	Radiopharmaceutiques
Récepteur aux opiacés	<sup>3</sup> H –Fentanyl, <sup>11</sup> C-MeJDTic
Récepteur à l'adrénomédulline	<sup>99m</sup> Tc-AM-L, <sup>99m</sup> Tc-PulmoBind
Bêta-adrénorecepteur	<sup>3</sup> H-Propranolol, <sup>14</sup> C-Propranolol
Récepteur à la sérotonine	<sup>11</sup> C-GSK215083
Récepteurs dopaminergiques	<sup>11</sup> C-NNC 112
Récepteur à l'endothéline ET(B)	<sup>18</sup> F-BQ3020
Neurokinine récepteur NK-1	<sup>18</sup> F-SPA-RQ
Récepteur peptide vasoactif intestinal	<sup>123</sup> I -VIP
Récepteur apparenté peptide-1 glucagon	[Lys (40) (Ahx-DOTA -(68)Ga) NH(2)]-exendin-4
Transporteur de la norépinephrine	<sup>123</sup> I-MIBG
Transporteur de la sérotonine	<sup>123</sup> I-ADAM, <sup>11</sup> C-DASB, <sup>14</sup> C-serotonin, <sup>123</sup> I-FP-CIT <sup>123</sup> I-iodoamphetamine, <sup>123</sup> I-HIPDM
Protéine transmembranaire ICAM-1	<sup>64</sup> Cu-labeled nanoparticules [92]
Récepteur somatostatine	<sup>111</sup> I-Octreotide, <sup>68</sup> Ga -DOTANOC
Transporteur Glucose	<sup>18</sup> F-FDG
MMPs, Gelatinase	<sup>99m</sup> Tc-DTPA-CLP, <sup>99m</sup> Tc-CTT
Aminopeptidase P	<sup>125</sup> I-833c, <sup>99m</sup> Tc-mAPP
Phosphatidylsérine externalisée	<sup>99m</sup> Tc-annexin V
Enzyme de conversion de l'angiotensine	<sup>3</sup> H-BPAP, <sup>11</sup> C-zofenoprilat, <sup>18</sup> F-fluorocaptopril, <sup>99m</sup> Tc-Lisinopril

Tableau 8. Résumés des radiotraceurs expérimentaux utilisés en TEP et en TEMP pour l'imagerie de la perfusion pulmonaire.

<sup>3</sup>H-BPAP = <sup>3</sup>H-benzoyl-Phe-Ala-Pro ; <sup>11</sup>C-MeJDTic = <sup>11</sup>C-N-methylated derivative of JDTic ((3R)-7-Hydroxy-N-[(2S)-1-[(3R,4R)-4-(3-hydroxyphenyl)-3,4-dimethylpiperidin-1-yl]-3-methylbutan-2-yl]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide); <sup>11</sup>C-NNC 112 = <sup>11</sup>C ((+)-8 -chloro-5- (7-benzofuranyl)-7 -hydroxy-3-methyl-2, 3,4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepine) ; <sup>18</sup>F-BQ3020 = <sup>18</sup>F -(Ala<sup>11,15</sup>Ac-ET-1 (6-21)) ; <sup>18</sup>F-SPA-RQ = <sup>18</sup>F-[2-fluoromethoxy-5- (5-trifluoromethyl-tetrazol-1-yl) - benzyl] -[(2 S, 3S)-2-phenyl-piperidin-3-yl] amine] ; <sup>123</sup>I-MIBG = <sup>123</sup>I-metaiodobenzyl guanidine ; <sup>123</sup>I-ADAM = <sup>123</sup>I-2- ((2-((dimethylamino)methyl) phenyl)thio)-5 -iodophenylamine ; <sup>11</sup>C-DASB = <sup>11</sup>C-3-amino-4- (2 -dimethylaminomethyl-phenylsulfanyl) benzonitrile ; <sup>123</sup>I-FP-CIT: <sup>123</sup>I-N-ω- fluoropropyl-2β-carbomethoxy-3β- (4 -iodophenyl) nortropane ; <sup>123</sup>I-iodoamphetamine = <sup>123</sup>I-N-isopropyl p-iodoamphetamine ; <sup>123</sup>I-HIPDM = <sup>123</sup>I-N, N,N'— trimethyl-N —, (2-hydroxy-3-methyl-5 iodobenzyl)-1, 3 propanediamine ; <sup>18</sup>F-FDG : <sup>18</sup>F-Fluoro-2-deoxy-2-D-glucose ; <sup>99m</sup>Tc-DTPA-CLP = <sup>99m</sup>Tc-DTPA-Cys-Leu-Pro-Gly-His-Trp-Gly-Phe-Pro-Ser-Cys ; <sup>99m</sup>Tc-CTT = <sup>99m</sup>Tc-Cys-Thr-Thr-His-Trp-Gly-Phe-Thr-Leu-Cys ; <sup>125</sup>I-833c = <sup>125</sup>I- Anticorps aminopeptidase recombinant P-specific ; <sup>99m</sup>Tc-mAPP = <sup>99m</sup>Tc-anticorps monoclonal marqué à l'aminopeptidase ; <sup>3</sup>H-BPAP = <sup>3</sup>H-benzoyl-phenylalanyl-alanyl-proline ; <sup>11</sup>C-zofenoprilat = <sup>11</sup>C -(4 S)-1-[(S)-3 -Mercapto-2-methylpropanoyl]-4-phenylthio-L-proline. AM-L = forme linéaire de l'adrénomédulline. Tableau redessiné, modifié et inspiré de [92-96]

### **3.6 Notions théoriques importantes reliées à la médecine nucléaire**

Nous avons dressé dans la dernière section un survol des différentes techniques d'imagerie en médecine nucléaire. Pour mieux comprendre la suite, les prochaines pages feront état des diverses notions de physique nucléaire qui supporte le développement d'un nouveau radiopharmaceutique. Ces chapitres cibleront le mode de détection TEMP ainsi que le radioisotope  $^{99m}\text{Tc}$  Technétium en raison du sujet de cette thèse. Toutefois, avant de poursuivre, voici un tableau comparatif et résumé des diverses modalités d'imagerie pulmonaire existantes en clinique.

Techniques	Avantages	Inconvénients
<b>Radiologie</b>		
<b>TDM</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Grande résolution spatiale</li> <li>2. Détails vasculaires excellents</li> <li>3. Relation linéaire entre le signal et la quantité de contraste absorbée</li> <li>4. Temps d'acquisition court</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reprise de l'examen limitée</li> <li>2. Exposition aux radiations modeste, mais plus élevée lors d'une étude de perfusion</li> <li>3. Résolution temporelle limitée</li> <li>4. Allergie potentielle aux agents de contraste</li> <li>5. Contraste iodé non sécuritaire en cas d'insuffisance rénale</li> </ol>
<b>IRM (contraste)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Haute résolution spatiale (1-60 mm)</li> <li>2. Bonne résolution temporelle (2,5 à 6 s)</li> <li>3. Bon rapport signal/bruit</li> <li>4. Technologie accessible et répétable</li> <li>5. Absence d'irradiation</li> <li>6. Permet l'étude de la vascularisation pulmonaire</li> <li>7. Permet d'évaluer la vitesse circulatoire, le débit cardiaque et les tensions artérielles pulmonaires</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Allergie potentielle</li> <li>2. À utiliser avec prudence dans les néphropathies et l'insuffisance rénale</li> <li>3. Les données pulmonaires sont limitées</li> <li>4. Quantification limitée par la non-linéarité de la concentration du contraste et le signal</li> <li>5. Moyennement invasif</li> <li>6. Pas de correction pour la densité tissulaire de façon routinière</li> <li>7. Visualisation modeste du parenchyme</li> <li>8. Certains protocoles laborieux à mettre en pratique et temps d'acquisition long</li> </ol>
<b>IRM ASL (Arterial spin labelling)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Analyse quantitative</li> <li>2. Reproductible</li> <li>3. Mesure de la perfusion capillaire</li> <li>4. Correction de l'atténuation possible</li> <li>5. Absence d'irradiation</li> <li>6. Non invasif</li> <li>7. Absence de contraste</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Technique difficile, temps d'acquisition long</li> <li>2. Faible rapport signal/bruit</li> <li>3. Limité habituellement à une zone pulmonaire</li> <li>4. Disponibilité du test faible</li> <li>5. Relativement coûteux</li> <li>6. Les données pulmonaires validées sont limités</li> </ol>
<b>Médecine nucléaire</b>		
<b>TEMP</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Largement accessible</li> <li>2. Abordable</li> <li>3. Mesure de la perfusion pulmonaire</li> <li>4. Analyse semi-quantitative, la correction pour l'atténuation est alors nécessaire</li> <li>5. La mesure de la perfusion est exprimée selon la perfusion moyenne relative</li> <li>6. Imagerie fonctionnelle</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Résolution spatiale limitée</li> <li>2. Nécessite un temps d'acquisition (image non instantanée)</li> <li>3. Moyennement invasif</li> <li>4. Reprise de l'examen limitée (T1/2 de l'isotope et radiation)</li> <li>5. Pas de correction de l'atténuation (sauf TEMP-CT)</li> <li>6. Radiation modérée et temps d'acquisition moyen</li> </ol>
<b>TEP</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mesure de la perfusion capillaire</li> <li>2. Analyses semi-quantitative et quantitative</li> <li>3. Meilleure résolution que TEMP et ASL-IRM</li> <li>4. Temps d'acquisition assez rapide</li> <li>5. Imagerie fonctionnelle</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reprise de l'examen limitée (T1/2 de l'isotope et radiation)</li> <li>2. Moyennement invasif</li> <li>3. Faible disponibilité</li> <li>4. Dispendieux</li> <li>5. Les données cliniques plus faibles comparativement au TEMP</li> <li>6. Radiation modérée</li> <li>7. Cyclotron nécessaire pour substrats isotopiques</li> </ol>
<b>Radiologie d'intervention</b>		
<b>Angiographie pulmonaire</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Elle reste indiquée en dernier recours</li> <li>2. Permet l'évaluation d'opérabilité des HTP post-embolique</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Invasif</li> </ol>
<b>Tomographie par impédance</b>		
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sécuritaire, non-invasif, permet le monitoring</li> <li>2. Peu coûteux</li> <li>3. Équipement compact et portatif</li> <li>4. Résolution temporelle élevée</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Résolution spatiale faible</li> <li>2. Détecte principalement les modifications</li> <li>3. Se limite à des données fonctionnelles</li> <li>4. Pauvrement utilisé en clinique</li> </ol>

**Tableau 9. Tableau comparatif des avantages et inconvénients des diverses techniques d'imagerie de la perfusion. Tableau redessiné, modifié et inspiré de [97]**

# Chapitre 4

# La médecine nucléaire

## 4.1 Les radionucléides

Dans la grande majorité des cas, les radionucléides sont des produits synthétisés à partir d'isotopes stables bombardés de particules à haute énergie par le moyen de réacteurs nucléaires ou d'accélérateurs. Suite au bombardement, ceux-ci se retrouvent dans un état excité et en excès de protons, de neutrons ou des deux [98]. Cette instabilité rend possible l'émission de rayons gammas qui seront par la suite détectés par une caméra à scintillation. On pourra également observer selon le type de radionucléide l'émission d'énergie sous forme de rayonnements  $\alpha$ ,  $\beta$ , de rayon X de fluorescence ou bien d'électrons Auger [89]. La désintégration se fera de façon exponentielle en cascade ou directement en un nouvel élément. L'activité radioactive qui représente le nombre de désintégrations par seconde pourra être estimée en tout temps selon l'équation  $A = A_0 e^{(-\lambda t)}$  ( $A_0$  = activité initiale,  $t$  = temps,  $\lambda = 0,693/T_{1/2}$  et  $T_{1/2}$  = demi-vie du nucléide) [89, 98, 99].

## 4.2 La décroissance radioactive

### 4.2.1 Rayonnement $\alpha$

Le rayonnement  $\alpha$  (figure 19 (B3)) est un rayonnement sous forme de noyaux d'hélium très peu pénétrant en raison de la masse et de la charge importante de ses particules. Par conséquent, elles seront arrêtées par une simple feuille de papier et ne pourront parcourir que quelques millimètres à quelques centimètres dans l'air. Néanmoins, ce rayonnement est très ionisant avec une énergie comprise entre 1 et 10 MeV [100]. Les nucléides qui seront concernés par ce type d'émissions sont ceux possédant un grand nombre de protons (uranium, radon, plutonium) et ils seront davantage utilisés en thérapie [100].

## 4.2.2 Transformation isobarique

La transformation isobarique se décrit comme une transmutation du noyau qui se traduit par une transformation du noyau atomique en un autre avec la conservation du nombre de masse. Ce mode de désintégration, est le cas le plus courant de radioactivité et comprends les désintégrations  $\beta^+$ ,  $\beta^-$  et la capture électronique [101].

### 4.2.2.1 Rayonnement $\beta$

Cette forme de rayonnement peut se faire sous deux types d'émission, soit bêta moins ( $\beta^-$ ) (figure 19 (B1)) ou bêta plus ( $\beta^+$ ) (figure 19 (B8)) dépendamment si la particule émise est chargée négativement (électron) ou positivement (positron). Avec des énergies variant entre 0.5 et 2 MeV, ce type de rayonnement à un pouvoir pénétrant supérieur aux particules  $\alpha$ [100]. La désintégration  $\beta^-$ , est principalement utilisée en thérapie. Quant à la désintégration  $\beta^+$ , elle constitue la source de l'imagerie TEP grâce à l'émission de positrons et à un phénomène physique appelé annihilation. Le positron est une particule chargée dont la masse est égale à celle de l'électron, mais de charge opposée. Lors de la désintégration, les positrons voyageront sur une courte distance. En fin de parcours, ceux-ci auront la capacité de s'annihiler avec un électron, par conséquent ce contact générera l'émission de deux photons gamma de 511 keV qui s'éloigneront selon la même trajectoire, mais de sens opposé. La captation de ces photons sur un détecteur de caméra TEP engendrera l'imagerie telle qu'on la connaît. Les radionucléides à émission  $\beta^+$  les plus utilisés sont le carbone-11, l'azote-13, le fluor-18, l'oxygène-15 et le rubidium-82 [99].



### **4.2.2.2 Capture électronique**

En compétition avec la désintégration  $\beta^+$ , la capture électronique, parfois appelé désintégration bêta inverse, est plus économique d'un point de vue énergétique et est un phénomène physique nucléaire durant lequel un noyau atomique déficient en neutrons absorbe un électron situé sur une couche électronique de l'atome (figure 19 (A9)). Cette capture entraînera la transformation d'un proton en neutron, mais également l'émission de rayons X de fluorescence ou d'un électron Auger. Ces émissions sont générées lorsqu'un électron du cortège électronique vient remplacer le vide créé par la capture du noyau.

## **4.2.3 Transitions produites par l'interaction électromagnétique**

### **4.2.3.1 Désexcitation du noyau**

Suite à une désintégration, les noyaux possèdent généralement des niveaux discrets d'énergie qui maintiendront le noyau dans un état excité. À ce stade, la désexcitation du noyau se fera par différentes méthodes, dont le rayonnement gamma, la conversion interne ou bien la transition isomérique [101].

#### **4.2.3.1.1 Émission de rayonnement $\gamma$**

Il s'agit d'une onde électromagnétique de courte longueur de même nature que la lumière ou les rayons X, mais beaucoup plus énergétique pouvant aller de quelques keV à plusieurs centaines de GeV. Très pénétrants, ces photons  $\gamma$ , sans charge, peuvent traverser des épaisseurs importantes de matière et même parcourir plusieurs mètres dans l'air. La plupart des désintégrations  $\alpha$  et  $\beta$  impliquent l'émission de rayonnement  $\gamma$  quasi simultanée [99].

#### 4.2.3.1.2 Conversion interne

La conversion interne est également un mode de désintégration par lequel un électron acquérant directement l'énergie d'excitation du noyau sera expulsé de l'atome. Tout comme la capture électronique, la conversion interne laissera une vacance qui sera comblée ultérieurement par un électron plus extérieur. L'énergie excédentaire de l'électron pourra être libérée comme discuté ci-haut par l'émission de rayon X de fluorescence ou par l'émission d'un électron Auger [101].

#### 4.2.3.1.3 Électron Auger

L'électron Auger est un processus parallèle à l'émission de rayon X dans la désexcitation atomique et consiste en une transition non radioactive. Dans ce processus, contrairement à l'émission de rayon X fluorescent, l'énergie excédentaire dégagée par l'électron qui comble l'espace laissé vacant pourra être transférée directement à un autre électron du cortège qui sortira alors de l'atome [101].

#### 4.2.3.1.4 Transition isomérique

La transition isomérique est un mode de désintégration qui se fait sans transmutation par la réorganisation des nucléons dans une configuration de plus faible énergie. Elle diffère de la simple émission de rayon  $\gamma$  puisque le noyau source reste dans un état excité durant un temps non négligeable. Le meilleur exemple de cette désintégration est sans aucun doute celui du  $^{99m}\text{Tc}$ .

**Info PulmoBind :** Le marquage du PulmoBind est réalisé avec le  $^{99m}\text{Tc}$ , par conséquent la désintégration de notre produit se fera principalement par transition isomérique, un mode de désintégration plus sécuritaire en raison de l'absence d'émission de particules ionisantes ce qui favorisera ainsi une bonne dosimétrie.

Le résumé des différentes formes de décroissances radioactives est représenté à la figure 19. On peut y observer la dynamique des neutrons, protons, des particules et des rayons gamma dans chacun des types de désintégration à l'aide d'un graphique (A) et sous forme d'équations (B).

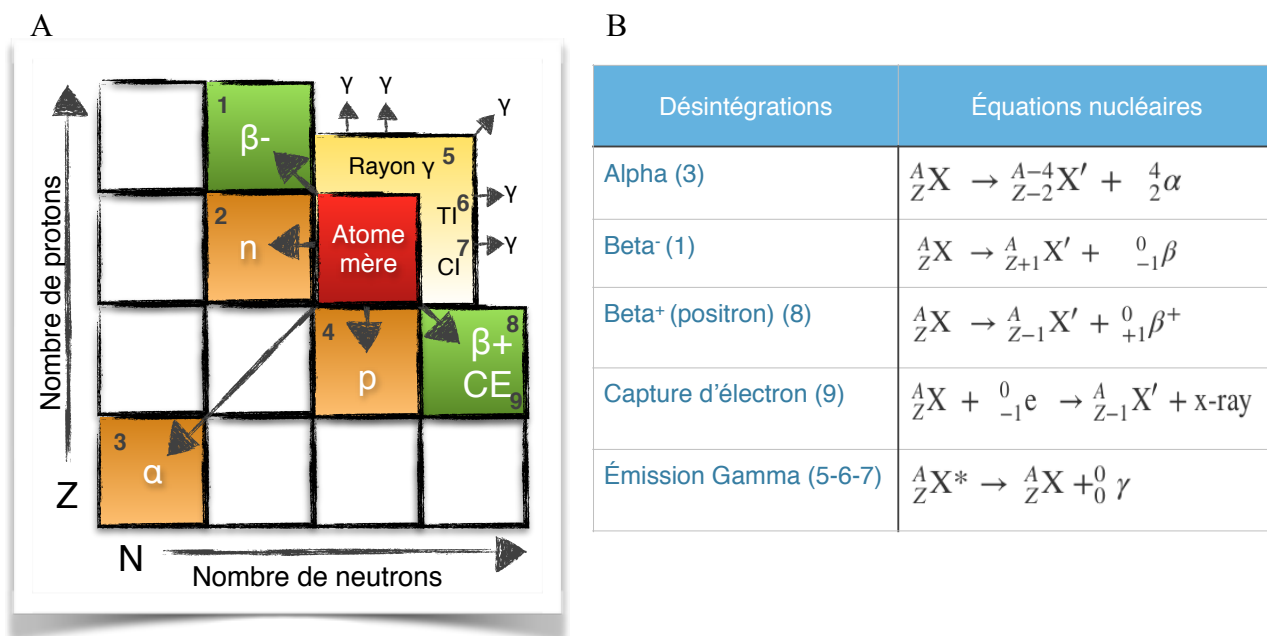


Figure 19. Illustration des différents types d'émission participant à la décroissance radioactive

Schématisation (A) et tableau des équations nucléaires des différents types d'émission participant à la décroissance radioactive d'un radionucléide vers un état plus stable (B). La désintégration radioactive peut s'effectuer par l'émission de rayonnements  $\beta^-$  (1), par l'émission de positrons  $\beta^+$  (8), par l'émission de particules  $\alpha$  (3), par l'émission de rayonnements  $\gamma$  (5-6-7), par l'émission de neutrons (2), par l'émission de protons (4), par TI (Transition isomérique) (6), par CI (Conversion interne) (7), et par CE (Capture électronique) (9). Tableau et image redessinés, modifiés et inspirés de wikipédia et de [98, 101]

## **4.3 Les radiopharmaceutiques**

Les radiopharmaceutiques en médecine nucléaire représentent des radionucléides de préférence neutre et sans activité biologique liés ou non à un vecteur. Ceux-ci peuvent servir à des fins de diagnostic et de pronostic (95 %) ou bien au traitement d'une maladie (5 %) [89]. Tout comme les médicaments, le processus d'homologation de ceux-ci par Santé Canada est réglementé. Les vecteurs peuvent être des molécules organiques, des anticorps monoclonaux, des agonistes, des antagonistes, des analogues, des particules et même des cellules sanguines possédant un tropisme pour un organe, un tissu ou bien une fonction.

### **4.3.1 Le marquage**

Il existe deux méthodes de marquage. La méthode directe qui implique une fixation directe du radioélément sur le vecteur et la méthode dite indirecte qui comprend l'utilisation d'un synthon bidirectionnel capable de fixer à la fois le vecteur et le radionucléide [102]. Le marquage doit être simple et également rapide tout en ayant une bonne pureté radiochimique. Un autre élément important est la stabilité de marquage qui dicte le temps disponible pour la réalisation de l'imagerie. Lors du développement d'un radiopharmaceutique, on tentera d'obtenir un maximum de stabilité à température pièce pour ainsi faciliter les procédures en clinique une fois le produit commercialisé.

### **4.3.2 La pureté**

Dans le but d'offrir un produit sécuritaire et efficace le degré de pureté du radiopharmaceutique doit être maximal. Cependant, la notion de pureté en médecine nucléaire comprend plusieurs critères [102].

- La pureté radiochimique (rendement de marquage) : C'est l'absence d'éléments autres, qui est représenté par le taux en pourcentage de la radioactivité du radionucléide concerné qui est présent dans le produit sous la forme chimique indiquée comparée à la radioactivité totale de ce même isotope radioactif présent dans le produit [102]. On peut également dire que c'est le nombre de molécules vectrices marquées sur le nombre total de molécules vectrices. La pureté radiochimique doit être idéalement supérieure à 95 %, par conséquent dans le cas contraire on évitera l'administration du produit. Comme les impuretés radiochimiques possèdent une biodistribution différente, celle-ci-ci peuvent créer une perturbation de l'image et une irradiation inutile du patient. Pour échapper à cette situation, le marquage peut être validé par plusieurs méthodes. Une procédure simple pouvant être utilisée en clinique est la chromatographie sur papier chromatographique.
- La pureté radionucléique : c'est l'absence d'autres isotopes, c'est le rapport en pourcentage de la radioactivité de l'isotope considéré sur la radioactivité totale du radiopharmaceutique .
- La pureté chimique : c'est le rapport en pourcentage entre la masse de matière présente sous la forme chimique indiquée et la masse totale de matière contenue dans la source, à l'exception faite des excipients et solvants éventuels.

#### 4.3.3 Temps demi-vie effectif

La demi-vie effective d'un radiopharmaceutique dépend de deux facteurs: la demi-vie biologique ( $T_{\text{bio}}$ ) qui représente la période au cours de laquelle l'activité du radiopharmaceutique décroît de moitié selon l'excrétion biologique et la demi-vie physique ( $T_{1/2}$ ) du nucléotide qui se

décrit par la durée au bout du quelle, l'activité radioactive est réduite de moitié [89, 102]. On pourra alors exprimer le temps de demi-vie effectif par la formule suivante :

$$\frac{1}{t_{\text{eff}}} = \frac{1}{t_{\text{bio}}} + \frac{1}{t_{1/2}}$$

#### 4.4 Le Technétium

La découverte de l'élément 43 a été officiellement confirmée en 1937 à l'Université de Palerme en Sicile, par les travaux de Carlo Perrier et Emilio Segrè [103]. Le Technétium-43 est le premier et le plus léger des éléments à avoir été artificiellement produit sur la planète [82, 89]. Son isotope le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  est un des radionucléides les plus utilisés en médecine nucléaire en raison de son accessibilité, de sa courte demi-vie (6,02 h), de sa capacité de liaison avec une multitude de vecteurs, d'un contrôle de la qualité facile à obtenir et de son type de désintégration par transition isomérique. Le produit final, le  $^{99}\text{Tc}$ , est considéré comme un composé stable en raison de sa longue demi-vie de  $2,21 \times 10^5$  ans [89]. Somme toute, l'ensemble de ces caractéristiques fait du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  un des radionucléides les plus sécuritaires.

Le technétium possède 7 électrons sur sa couche de valence et 9 degrés d'oxydation de 1- à 7+. La stabilité du produit dépendra de la liaison de celui-ci avec le ligand. Les états 7+, 4+ et 3+ d'oxydation sont les plus stables en milieu aqueux. La forme commerciale du technétium obtenue par élution en clinique est le pertechnétate de sodium ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ), qui est en soi non réactif. Par conséquent, il sera indispensable de réduire celui-ci afin de produire une réaction. Pour ce faire, l'agent réducteur le plus utilisé sera le chlorure d'étain ( $\text{SnCl}_2$ ).



En plus de l'étain, d'autres éléments pourront être présents dans les trousse de marquage pour assurer une efficacité de liaison. De ceux-ci on peut retrouver : une solution tampon pour maintenir un pH optimal pour la réaction, des antioxydants (ex : acide ascorbique) pour prévenir la réoxydation du complexe technétié formé, des accélérateurs pour augmenter la pureté et l'efficacité de marquage, des catalyseurs (ex : citrate) pour faciliter le marquage et des agents de remplissage (ex : sucre) pour favoriser la préparation et la solubilisation. Lors d'un marquage, on travaillera toujours en excès de ligand et d'agent réducteur dans l'intention d'éviter la présence ainsi que la formation du  $^{99m}\text{TcO}_2$  libre, une impureté radiochimique.

Plusieurs facteurs peuvent être à la source d'un mauvais marquage et d'une diminution de la pureté radiochimique :

- La présence d'oxygène dans la fiole d'entreposage et au moment de la réaction peut avoir une incidence néfaste sur l'étain. En effet, au contact avec l'oxygène celui-ci aura tendance à se transformer en étain stannique perdant ainsi son pouvoir réducteur. Par conséquent, lors du marquage, il y aura un taux élevé de pertechnétate ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) en solution qui ne sera pas réduite. Cette impureté pourra être visible en imagerie par une augmentation de la captation au niveau des glandes salivaires, du plexus choroïde, de l'estomac et de la glande thyroïde. La réoxydation du  $^{99m}\text{Tc}$  réduit est également une source possible de pertechnétate ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) en solution.
- L'étain stannique peut précipiter également avec certaines formes réduites du Tc pour former des colloïdes (colloïdes d'étain) [102].
- La présence d'un éluat de faible activité. Le  $^{99m}\text{Tc}$  et le  $^{99}\text{Tc}$  sont chimiquement identiques et compétitionnent de façon similaire pour le ligand [102].
- Une présence insuffisante d'agent réducteur ou de ligand.

#### 4.4.1 Générateur de Technétium en clinique

L'approvisionnement en  $^{99m}\text{Tc}$  est facilité par l'achat de générateur au molybdène-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ). Celui-ci est produit essentiellement par cinq réacteurs dans le monde : le National Research Universal Reactor (NRU) au Canada, le BR-2 du SCK-CEN en Belgique, le SAFARI-1 en Afrique du Sud, le HFR de Petten (Pays-Bas), et enfin le réacteur OSIRIS du CEA à Saclay (France) [104]. Il est le fruit de la fission de uranium-235 ( $^{235}\text{U}$ ). Par des méthodes radiochimiques, le  $^{99}\text{Mo}$  est séparé des autres produits du réacteur et disposé sur une colonne d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de pH 5. À ce pH, le  $^{99}\text{Mo}$  sera chargé négativement et la colonne positivement, ce qui permettra le trappage du  $^{99}\text{Mo}$  au sein de celle-ci. Le générateur est par la suite autoclavé et vendu. Il suffira tout simplement d'éluer la colonne avec du normal salin 0,9 % pour ainsi récupérer le  $^{99m}\text{Tc}$  sous forme de sodium pertechnetate ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) qui sera alors prêt à être utilisé à des fins de marquage. La cascade de désintégration du  $^{99}\text{Mo}$  est représentée à la figure 20 [2].

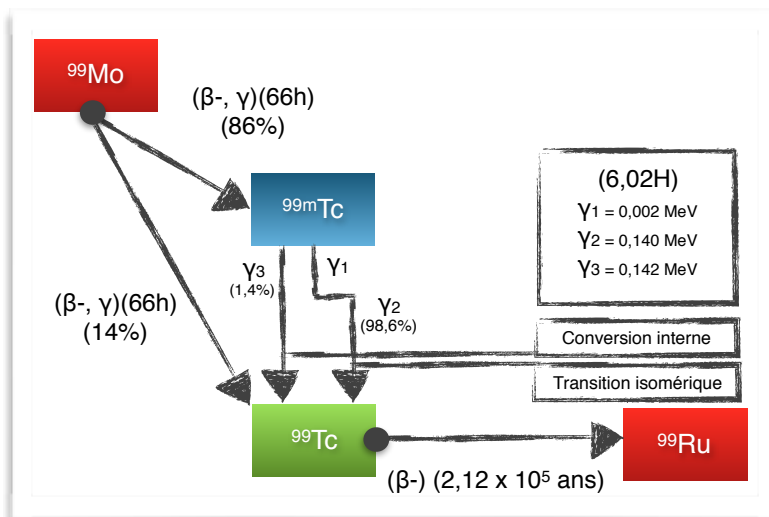


Figure 20. Schématisation de la désintégration du  $^{99}\text{Mo}$

Au moment de la désintégration de celui-ci, on obtiendra comme produit 86% de  $^{99m}\text{Tc}$  contre 14% de  $^{99}\text{Tc}$ . Le  $^{99m}\text{Tc}$  sera capté par élution sous forme de sodium pertechnetate ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ). Par transition isomérique et avec une demi-vie de 6,02H, 98,4 % du  $^{99m}\text{Tc}$  se désintégrera en  $^{99}\text{Tc}$  avec émission de rayon gamma de 140 keV ce qui permettra l'acquisition d'images par TEMP une fois injecté. Inspiré de [2]



## **4.4.2 Chaîne de détection et d'acquisition de l'image**

### **4.4.2.1 La caméra gamma**

La caméra gamma est un outil important en clinique pour visualiser sous forme d'image la biodistribution dans l'organisme d'un radiopharmaceutique. Sa technologie est basée sur des principes qui ont été mis au point par H. Angers dans les années 1960 [82]. L'idée est simple: transformer l'énergie photonique  $\gamma$  en un courant électrique mesurable et exploitable. Pour ce faire, la caméra sera équipée de collimateurs, d'un cristal scintillant, d'un guide de lumière, d'un ensemble de tubes photomultiplicateurs, d'un convertisseur et d'une station informatique [2]. Voici la description sommaire de cette chaîne de détection.

#### **4.4.2.1.1 Collimateurs**

Les collimateurs, conçus généralement de plomb ou de tungstène, ont pour rôle de sélectionner de façon spatiale les photons avant qu'ils n'atteignent le cristal selon une incidence particulière. Cette sélection de photons permettra de faciliter la localisation de la source d'émission. Par le fait même, le collimateur déterminera en grande partie la résolution spatiale et la sensibilité du système et le type de radioélément pouvant être utilisé.

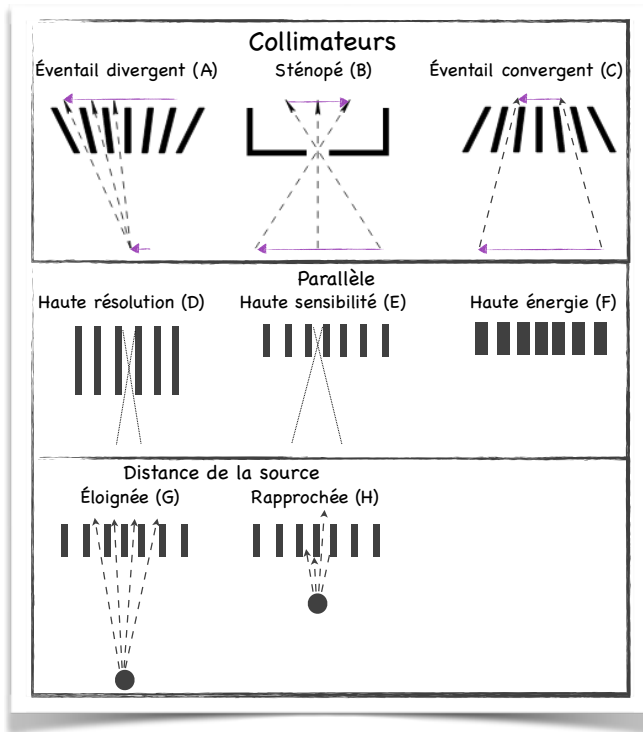
La sensibilité (ou efficacité géométrique) des collimateurs dépendra du rapport entre le nombre de photons transmis et le nombre de photons émis. En d'autres mots, plus ils sont sensibles, plus ils laissent passer de photons. Par conséquent, l'augmentation du diamètre et la diminution de la profondeur des canaux augmenteront la sensibilité du collimateur. Pour sa part, la résolution spatiale est représentée par l'aptitude que possède le collimateur à séparer deux sources ponctuelles rapprochées. La résolution spatiale augmentera lors d'une diminution de la taille des canaux et lors de l'augmentation de la profondeur de ceux-ci. Il faut spécifier qu'avec

le choix d'un collimateur, il y a toujours un compromis entre la résolution spatiale et la sensibilité.

Les différents types d'évènements pouvant se produire sur le rayonnement émis sont: l'absorption, la diffusion, la pénétration septale ou bien l'atteinte du cristal. Ils sont illustrés à la Figure 21 [100]. Il existe différentes géométries de collimateurs: parallèles, en éventail (convergent/divergent) ou bien sténopés (Figure 21) [105].

Les collimateurs parallèles sont ceux les plus employés en clinique et selon leurs types de septas en place, ceux-ci présenteront des caractéristiques distinctes. Par exemple, comme mentionné ci-haut, l'utilisation de septas plus allongés améliorera la résolution au détriment de la sensibilité, tandis que l'usage de septas plus massifs rendra possible la détection de radiopharmaceutiques plus énergétiques (figure 21 D-E-F). Ainsi, il y aura sur le marché des collimateurs de basse énergie ( $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ), de moyenne énergie ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ) et de haute énergie ( $^{131}\text{I}$ ). La figure 21 G et H démontrent également l'importance de la distance séparant la source et le collimateur parallèle. On peut y observer que l'éloignement d'une source entraînera une élévation de l'incertitude sur sa localisation et une perte de la résolution spatiale [105]. Par conséquent, lors d'une acquisition, il est recommandé de se rapprocher le plus possible de la source pour améliorer la résolution spatiale.

Les collimateurs convergents (figure 21A) permettront d'obtenir un rapetissement des images, à l'inverse des collimateurs divergents (figure 21C) qui pour leur part permettront de mieux visualiser les plus petites structures par son effet grandissant. Finalement, le collimateur à trou sténopéique a pour caractéristique de projeter une image renversée sur le cristal et légèrement agrandie.



**Figure 21. Représentation des divers collimateurs disponible en TEMP pour l'acquisition d'images**

Les collimateurs convergents (C) permettront d'obtenir un rapetissement des images à l'inverse d'un collimateur divergent (A) qui pour sa part permettra de mieux visualiser les plus petites structures par son effet grandissant. L'utilisation de septas plus allongés améliorera la résolution au détriment de la sensibilité (D vs E), tandis que l'usage de septas plus massifs permettra la détection de radiopharmaceutique plus énergétique. On peut observer à H en comparaison avec G que l'éloignement d'une source entraînera une élévation de l'incertitude sur sa localisation et une perte de la résolution spatiale. [99, 100]

#### 4.4.2.2 Le cristal scintillant et guide de lumière

Le cristal scintillant possède un rôle essentiel dans la chaîne de détection en permettant l'absorption des rayons  $\gamma$  et la conversion de ceux-ci en énergie lumineuse de plus basse intensité (par effet photoélectrique ou diffusion Compton). Les caméras sont généralement équipées d'un cristal d'iodure de sodium dopé au thallium (NaI (Tl)) de faible épaisseur (6 à 15 mm) [89]. Ce type de cristal possède un certain nombre de caractéristiques qui en font un excellent détecteur. Dans l'ensemble, il est transparent à la lumière scintillante, possède une excellente aptitude à transformer l'énergie des photons gammas en énergie lumineuse et il est également possible de réaliser des cristaux de grosse taille qui permet d'augmenter l'efficacité de détection tout en conservant ses qualités de transparence.

D'autre part, puisque la probabilité de l'interaction photoélectrique est proportionnelle au cube du nombre atomique, la présence de l'iode ( $z=53$ ) permet à ce cristal d'augmenter

considérablement la probabilité d'interaction photons-électrons. De ce fait, seulement dix millimètres d'épaisseur de ce cristal suffisent pour absorber plus de 90 % des photons de 150 keV [98]. Il est important de mentionner que l'épaisseur du cristal est également un enjeu important étant donné que l'augmentation de l'épaisseur provoquera une hausse de la sensibilité de détection par l'élévation de son pouvoir d'absorption, mais diminuera la résolution spatiale en raison de l'éloignement des tubes photomultiplicateurs.

Pour ce qui est du mode de fonctionnement, la lumière réémise par le NaI, préalablement excité par les photons  $\gamma$ , sera absorbée par le thallium et réémise en une fraction constante sous forme de photons ultraviolets de 3 eV auxquels le cristal est transparent. Les photons de scintillation seront alors collectés par les tubes photomultiplicateurs. Ceux-ci seront séparés du cristal par un guide de lumière en verre qui favorisera le cheminement de celle-ci et permettra d'adapter l'indice de réfraction entre le cristal et le vide des photomultiplicateurs. [89]

#### **4.4.2.3 Les tubes photomultiplicateurs et le système électronique d'acquisition**

Le rôle des tubes photomultiplicateurs est de convertir le signal lumineux en un signal électrique quantifiable et exploitable. Par l'intermédiaire de la photocathode, les flux de photons seront convertis en photoélectrons. Ceux-ci seront par la suite accélérés, amplifiés et collectés sur une anode où une brève impulsion électrique sera créée. On utilisera un préamplificateur pour maintenir l'intégrité du signal et d'un système électronique d'acquisition constitué d'un intégrateur commuté, d'un convertisseur analogique numérique et d'une station électronique [99].

#### **4.4.2.4      Finalement une image !**

L'image obtenue consiste en une matrice composée de plusieurs pixels (2D) ou voxels (3D). Les matrices les plus fréquentes sont de 80x80, 160x160, 256 x 256, 320 x 320 et 512 x 512 pixels. Le nombre de pixels sélectionnés, le diamètre du champ et l'épaisseur de la coupe conditionneront la résolution spatiale.

##### **4.4.2.4.1      L'imagerie planaire**

La résolution spatiale de l'imagerie planaire se situe environ entre 8 et 12 mm [89]. Lors de cette intervention une seule partie du corps est explorée, celle correspondant au champ de vue de la caméra. En faisant déplacer de façon linéaire et à vitesse constante la table d'examen sous le détecteur, il est possible de réaliser une acquisition pour le corps entier. Ce type d'acquisition est caractérisée comme étant pancorporel (balayage).

On peut différencier également deux modes d'acquisitions, soient le mode statique ou bien dynamique. On parle d'imagerie statique lorsqu'une seule image est acquise à un temps  $x$ . L'acquisition dynamique consiste quant à elle en une acquisition de plusieurs clichés à des moments constants, ce qui permettra d'étudier la distribution du radiotraceur ou bien d'explorer l'activité de celui-ci dans un organe sélectionné en fonction du temps. Ces deux modes d'acquisitions peuvent être également utilisés en tomographie.

##### **4.4.2.4.2      L'imagerie tomographique**

La tomographie est tout simplement une autre technique d'imagerie permettant la reconstruction en 3 dimensions des organes et de leur métabolisme à partir d'images planes. Cette acquisition est possible par la rotation des têtes de détection autour du patient.

#### **4.4.2.5 Les limites de l'imagerie gamma**

##### **4.4.2.5.1 L'interaction des rayons $\gamma$ avec la matière**

En imagerie médicale, il est important de produire des clichés de bonne qualité afin de poser un diagnostic juste. Cependant, la précision qualitative et quantitative des images obtenues en TEMP dépend grandement du nombre de photons de la source d'émission pouvant atteindre le détecteur de la caméra. Malheureusement, ce n'est pas l'ensemble des photons qui pourront parvenir à celui-ci et cette variation peut être attribuable à des facteurs physiologiques relatifs au patient (mouvements du patient, mouvements physiologiques, le poids), relatifs au radiopharmaceutique (pharmacocinétique du traceur), relatifs à la caméra gamma (collimateurs) ou bien relatifs à des facteurs physiques d'atténuation, de diffusion ou de bruit de mesure. Puisque les faisceaux de photons interagissent avec la matière, le nombre de photons initialement présents dans celui-ci diminuera temporellement par des phénomènes d'absorption photoélectrique (effet photo-électrique) et de diffusion (effet Compton, effet de matérialisation et effet Rayleigh). Par conséquent, un photon atténué ou bien diffusé qui atteindra le détecteur amènera avec lui un lot d'informations erronés au sujet de la localisation et de l'intensité de son point d'émission [100].

##### **4.4.2.5.2 La diffusion Compton**

Dans l'effet Compton (Figure 23 (I)), le photon entre en contact avec un électron et continue dans une trajectoire différente avec une énergie moindre. La quantité d'énergie transférée et la ligne de trajectoire dépendront de la façon dont le positron aura frappé l'électron (choc frontal versus tangentiel). Ce phénomène est plus susceptible de se produire avec des électrons faiblement liés à leur atome et des énergies photoniques faibles. En effet, ceux

fortement attachés au noyau sont plus susceptibles de participer à l'effet photoélectrique. Malheureusement, la diffusion de Compton pourra entraîner lors de l'analyse une perte de résolution spatiale et une quantification biaisée de l'activité réelle. En sachant que les photons diffusés sont de plus faible énergie, il est possible de filtrer et de sélectionner les photons à l'aide d'une fenêtre énergétique pré-établie en fonction du radioisotope utilisé. Cette fenêtre d'acquisition permet de sélectionner les photons non diffus. La sélection de la largeur et du centre énergétique de la fenêtre d'acquisition, l'association de plusieurs fenêtres énergétiques ainsi que la modélisation de la diffusion permettent lors de l'analyse de diminuer les répercussions de l'effet Compton. [2, 100]

#### **4.4.2.5.3 La diffusion Rayleigh**

Dans l'effet Rayleigh (Figure 23 (J)), il s'agit d'une collision élastique entre le photon et un électron du milieu possédant une énergie de liaison forte. Le photon va changer de direction sans perte d'énergie et il n'y aura pas de modification de la trajectoire de l'électron. La diffusion de Rayleigh est négligeable dans les tissus mous. Toutefois, cette diffusion est plus fréquente au niveau du collimateur et du cristal [100].

#### **4.4.2.5.4 Effet de matérialisation/production de paire**

Dans l'effet de matérialisation (Figure 23 (K)), le photon suffisamment énergétique ( $> 1\,022\text{ eV}$ ) se matérialisera en une paire d'électron-positron lors de son passage à proximité du noyau. Ce processus sera suivi d'une annihilation dans laquelle le positon et un électron s'annihilent mutuellement pour générer une paire de photons de  $511\text{ keV}$  émis à  $180^\circ$  dans des directions opposées [100].

#### **4.4.2.5.5 L'effet photoélectrique**

Dans l'effet photoélectrique (Figure 23 (L)), le photon est complètement absorbé par un atome et un photoélectron est éjecté. À la suite à cet évènement, l'électron vacant entraînera un réarrangement du cortège électronique de l'atome, avec l'émission de rayon X de fluorescence ou bien l'émission d'un électron Auger. Ce mode d'interaction est prédominant au niveau des rayonnements gammas de faible énergie ( $\leq 100$  keV) [100].

#### **4.4.2.6 Facteurs relatifs à la caméra gamma**

##### **4.4.2.6.1 La sensibilité**

Une caméra gamma possède une sensibilité qui est étroitement liée à sa capacité de détection et d'enregistrement des évènements émis par une source radioactive. Par conséquent, pour une même activité présente et pour un temps d'acquisition similaire, plus la sensibilité de l'appareil est élevée plus il y a d'évènements détectés. Cette sensibilité pourra varier en fonction de la nature du cristal, du nombre de détecteurs, du type de collimateur ainsi que la distance de celui-ci par rapport à la source [2].

##### **4.4.2.6.2 L'effet de volume partiel**

L'effet de volume partiel peut être défini par une sous estimation locale de l'intensité par rapport à la réalité en raison principalement de la faible résolution spatiale des appareils d'acquisition. Ce phénomène affecte tout particulièrement les objets de petit volume dont le diamètre se retrouve en deçà de l'épaisseur de la coupe. En réponse aux rayons gamma perçus, le détecteur étale le signal et par conséquent une certaine partie de l'activité extérieure est détectée à l'intérieur de l'objet et vice versa, ce qui introduit un biais quantitatif (figure 22) [106].



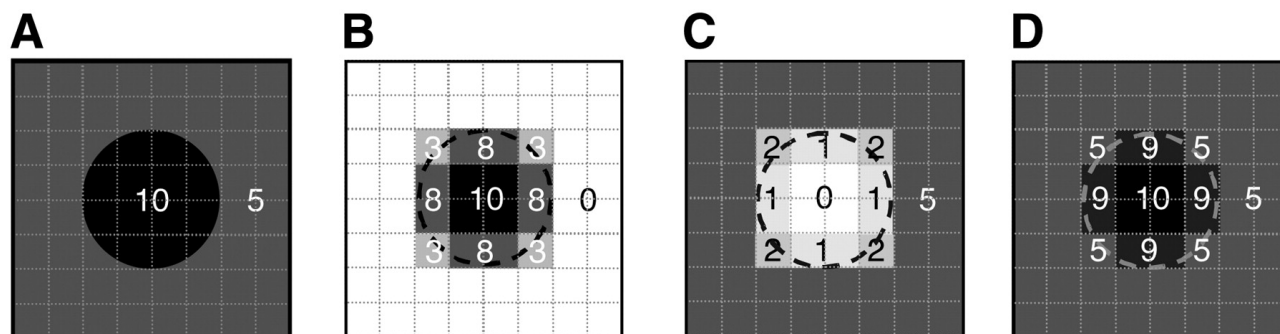


Figure 22. Effet du volume partiel

En réponse aux rayons gammas perçus de l'activité réelle (A), le détecteur étale le signal et par conséquent une certaine partie de l'activité intérieure est détectée à l'extérieur de l'objet (B) et une certaine partie de l'activité extérieure est détectée à l'intérieur de l'objet (C). Par le fait même, il y aura une sous-estimation de l'activité aux bordures de l'objet qui amènera un biais quantitatif (D). Image de Marine Soret et al. reproduction autorisée [106]

#### 4.4.2.6.3 Le temps mort

La résolution temporelle est également importante en médecine nucléaire et elle est étroitement associée au temps mort du système. Il s'agit d'un intervalle durant lequel le système ne peut détecter d'autres événements, en d'autres mots une période où la caméra est dite paralysée. Ce phénomène est principalement dû au cristal et à l'électronique qui lui est associée. Par conséquent, dans les moments de haut taux de comptage, il y aura une sous-estimation de l'activité entraînant également un biais quantitatif [100].

#### 4.4.2.7 Facteurs relatifs au radiopharmaceutique

Plusieurs facteurs au niveau du radiopharmaceutique peuvent influencer la qualité de l'acquisition. En effet, la pureté radiochimique, radionucléique et chimique de celui-ci après reconstitution ainsi que le pourcentage de marquage avant injection pourront affecter la pharmacocinétique et le taux de captation du produit. De plus, lors de sa distribution au niveau de l'organisme, le radiopharmaceutique ne possède pas une spécificité parfaite. Par conséquent,

celui-ci pourra se fixer sur des tissus non cibles, créant ainsi une activité parasitaire externe qui dégradera la qualité de l'image et pouvant affecter l'analyse et l'interprétation.

#### **4.4.2.8 Facteurs relatifs au patient**

##### **4.4.2.8.1 Une immobilisation impossible**

En raison du temps d'acquisition des images en médecine nucléaire, les mouvements du patient peuvent provoquer des artéfacts. Les examens avec une courte période d'acquisition permettent de diminuer ces artéfacts. D'autres mouvements de type physiologique tels que la respiration et le battement cardiaque entraînent un flou cinétique réduisant également la qualité de l'image obtenue. Néanmoins, par l'utilisation de méthodes et d'analyses plus complexes, ceux-ci peuvent être corrigés par synchronisation de l'image par rapport à l'amplitude respiratoire et l'électrocardiogramme.

##### **4.4.2.8.2 L'atténuation**

L'atténuation est un phénomène qui pourra fluctuer en fonction de la composition du milieu, de l'épaisseur du tissu et de l'énergie des photons présents. Au niveau du poumon, les divers tissus qui l'entourent ont différentes densités atténuant ainsi les photons d'une manière différente et pouvant diminuer la qualité de l'image. De plus, le poids du patient ainsi que la présence des seins chez la femme lors de l'analyse du thorax peuvent affecter également la qualité et la quantification des images en raison de l'augmentation du coefficient d'atténuation.

[2, 89, 99]

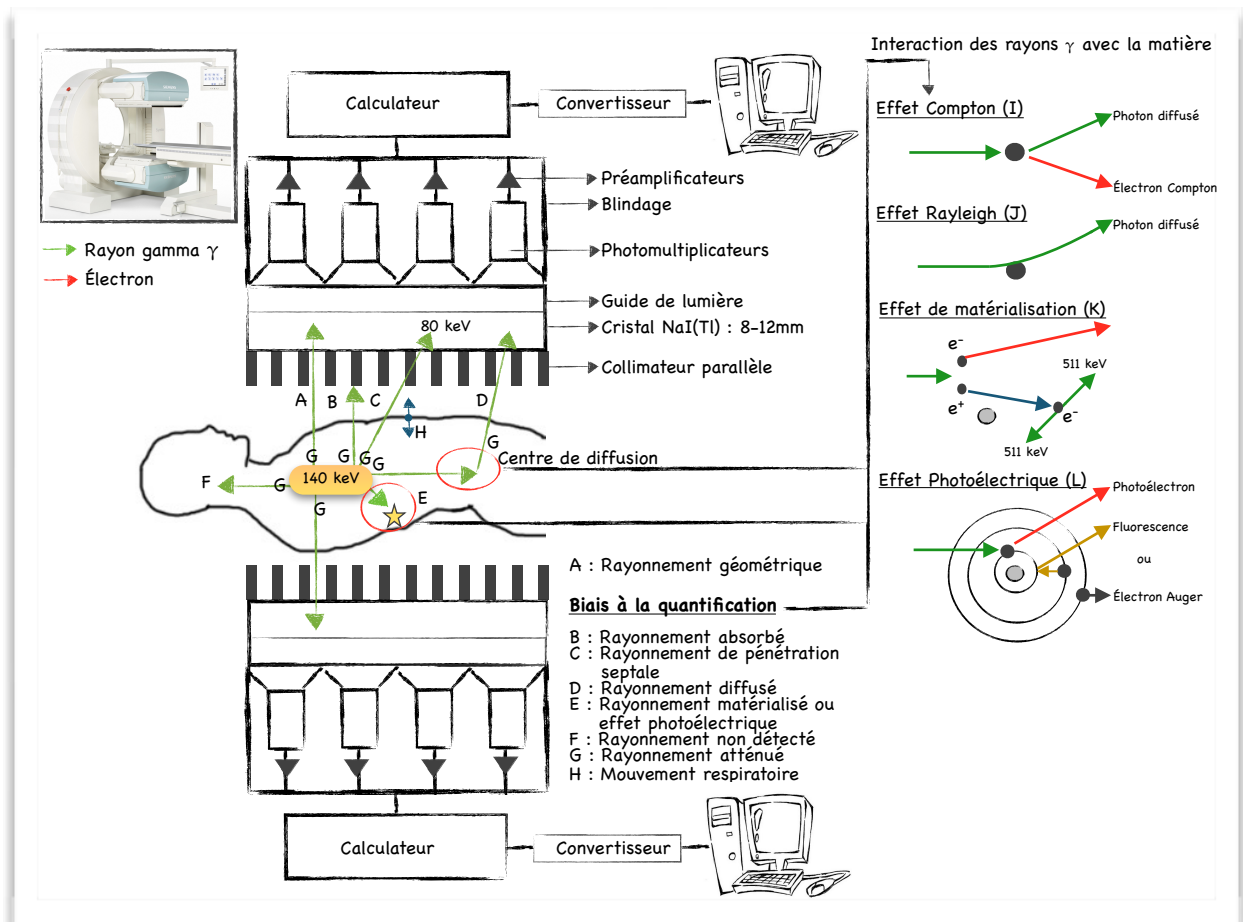


Figure 23. Principe de détection d'une caméra gamma et les biais quantitatifs possibles qui s'y rattachent

Chaque tête de détection d'une caméra gamma est constituée, d'un collimateur, d'un cristal scintillateur, d'un guide de lumière, d'un réseau de photomultiplicateurs et d'une électronique de détection et de positionnement permettant de reconstituer l'image de la source. Plusieurs biais quantitatifs peuvent affecter les analyses des images en TEMP. On peut retrouver comme obstacle à la quantification la présence : de rayonnements absorbés (B), de rayonnements avec pénétration septale (C), de rayonnements diffusés (D) par l'effet Compton (I) ou Rayleigh (J), de rayonnements matérialisés (E)(K), de rayonnements affectés par l'effet photoélectrique (E)(L), de rayonnement atténué (G), les rayonnements non détectés (F) et du mouvement respiratoire (H) et cardiaque. Figure dessinée et inspirée de [2, 89 , Saha, 2013 #430]

### **4.4.3 La dosimétrie**

Les doses injectées en médecine nucléaire sont des doses traceurs généralement de faible quantité. Toutefois la radioprotection s'appuie sur le principe que toute dose, aussi faible soit-elle, peut représenter un risque pour le patient. Dans cette optique, pour assurer la protection de la population, les instances réglementaires demandent de procéder à des études de dosimétrie afin d'estimer les doses de radioactivité absorbées. Les calculs de cette dosimétrie seront influencés par 4 facteurs importants : la dose de radioactivité, le temps d'exposition, le type de rayonnement et la partie du corps exposée. Par conséquent, il est toujours important de porter une attention particulière à ces facteurs lors du développement d'un radiopharmaceutique. À noter également que la dosimétrie chez la femme est toujours plus élevée en raison entre autres de la présence des gonades au niveau intra-abdominal et la proximité plus élevée des organes internes. En effet, en d'autres mots la disposition des organes intra-abdominaux qui est caractéristique à la femme favorisera l'irradiation d'organes sensibles et influencera à la hausse le calcul de la dosimétrie. Pour bien comprendre les unités de doses utilisées en radioprotection, les prochains paragraphes ainsi que la figure 24 définiront et résumeront ceux-ci.

#### **4.4.3.1 Dose absorbée (D)**

La dose absorbée est une mesure de l'énergie déposée dans un volume de masse donné. Son unité du système international est le Gray (Gy) équivalant à un joule/kg.

#### **4.4.3.2 La dose équivalente (H)**

Pour une même dose absorbée, les effets biologiques des divers types de rayonnement sont différents. Par conséquent, cette mesure prend en compte la dangerosité relative du

rayonnement. Elle s'exprime en Sievert (Sv) ou en Rem. Les facteurs de pondération des rayonnements  $w_R$  sont listés au tableau 10.

Type de rayonnement et gamme d'énergie	Facteurs ( $w_R$ )
Photons, toutes énergies	1
Electrons et muons, toutes énergies	1
Neutrons, énergie <10 keV	5
10 keV à 100 keV	10
>100 keV à 2 MeV	20
>2 MeV à 20 MeV	10
>20 MeV	5
Protons (sauf protons de recul), énergie >2 MeV	5
Particules alpha, fragments de fission, noyaux lourds	20

**Tableau 10. Tableau énumérant les facteurs de pondération des différents rayonnements**

**Les valeurs de  $w_R$  sont liées au transfert linéique d'énergie. Plus celui-ci est élevé, plus le rayonnement est ionisant et dangereux pour la santé humaine. Tiré de [89, 107]**

#### 4.4.3.3 La dose efficace (E)

La dose efficace pour sa part tient compte de la sensibilité des différents organes. Elle est la somme des doses équivalentes aux organes pondérés. Elle ne peut être mesurée que par des logiciels de modélisation sur fantôme anthropomorphe tel qu'Olinda/EXM, un logiciel développé au département des sciences radiologiques de l'Université de Vanderbilt (Virginie, USA). Les différents facteurs de sensibilité tissulaire utilisés dans le calcul de la dose efficace sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tissus	Facteurs (wt)	$\Sigma wT$
Gonades	0,20	0,20
Moelle osseuse (rouge), colon, poumon et estomac	0,12	0,48
Vessie, seins, oesophage, foie, thyroïde et l'ensemble des autres organes*	0,05	0,30
Surface osseuse et peau	0,01	0,02
	Total	1,0

\* Glandes surrénales, cerveau, régions respiratoires extra thoraciques, vésicule biliaire, coeur, les reins, les ganglions lymphatiques, muscles, muqueuse buccale, le pancréas, la prostate, l'intestin grêle, la rate, le thymus et l'utérus/col

Tableau 11 Tableau des facteurs de pondération tissulaire utilisés lors d'étude de dosimétrie. Tiré de [107]

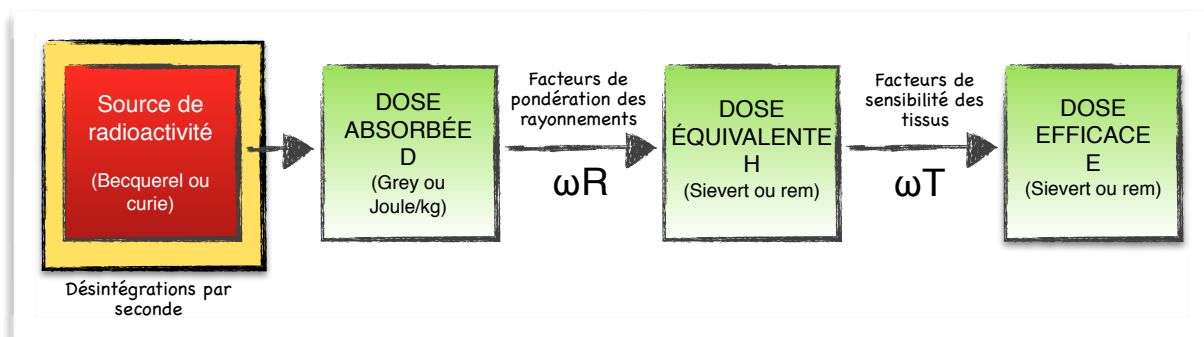


Figure 24. Unités de mesure utilisées en radioprotection

La source de radioactivité peut se calculer en Curie ou en Becquerel et représente le nombre de rayonnements émis. La dose absorbée par un corps exposé sera exprimée en Gray soit des joules par kilogramme. En pondérant cette dose absorbée en fonction du type de rayonnement présent nous obtenons ainsi la dose équivalente (H). Pour sa part, la dose efficace pourra être déterminée par la pondération de la dose équivalente par le facteur de sensibilité tissulaire. image redessinés, modifiés et inspirés de wikipédia et de [107, 108]

#### 4.4.3.4 Recommandation des instances réglementaires

Pour donner des balises dans la recherche et développement des nouveaux radiopharmaceutiques, les instances réglementaires ont statué sur les doses maximales admissibles pour assurer la protection du public face à l'exposition radioactive. Ces limitations

sont formulées sous la recommandation 21 CFR 361.1 (b)(3)(i) de la FDA[109]. Les doses équivalentes admissibles sont plus faibles pour les organes plus sensibles à la radiation tels que pour la moëlle osseuse, le cristallin de l'œil et les gonades. Pour ceux-ci et pour la dose efficace pancorporelle, une dose maximale de 30mSv en simple dose et de 50 mSv sur une base annuelle est considérée comme étant acceptable et sécuritaire. Toutefois, les autres organes peuvent recevoir 50 mSv en simple dose et 150 mSv sur une base annuelle.

	Simple dose (efficace) (mSv)	Dose annuelle (efficace) (mSv)
Dose pancorporelle	30	50
Organes ou systèmes	Simple dose (équivalente) (mSv)	Dose annuelle (équivalente) (mSv)
Moelle osseuse	30	50
Cristallin de l'œil	30	50
Gonades	30	50
Autres organes	50	150

**Tableau 12. Tableau des doses de radioactivité maximales admissibles sur une base annuelle et pour une simple dose. Tiré de [110]**

**Info PulmoBind :** Lors des études précliniques, l'analyse de la dosimétrie chez le chien a permis d'extrapoler les doses sécuritaires chez l'homme. À la lumière de cette analyse, la dose de 15 mCi a été jugée comme sécuritaire. À cette dose, les résultats de dosimétrie satisfaisaient l'ensemble des recommandations et des critères exigés par les instances réglementaires. Voir annexe 1 pour l'ensemble des données dosimétriques précliniques

# Chapitre 5



## L'adrénomédulline

Découverte à partir de tissus isolés de phéochromocytomes par Kitamura et al en 1993, l'adrénomédulline (AM) est un peptide vasodilatateur de la famille de la calcitonine [111]. Outre l'AM, cette famille comprend 5 autres membres, dont la calcitonine (CT), l'amyline (AMY), deux « calcitonin gene-related peptide »  $\alpha$ CGRP et  $\beta$ CGRP et l'AM 2 (AM2) qu'on peut également nommer l'interméline (IMD). Les effets physiologiques de ces derniers seront diversifiés. On notera entre autres la diminution de la résorption osseuse (CT), la vasodilatation (AM, AM2 et CGRP), la vidange gastrique (AMY et AM2), l'angiogenèse (CGRP et AM) et la sensation de la douleur (CGRP et CT) [112].

Largement distribués au sein de l'organisme, on note la présence de l'AM et de son ARNm au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, des reins, des poumons, du cerveau, du système gastro-intestinal et du système immunitaire [113]. La circulation plasmatique de l'AM se chiffre en picomolaire (10-20 pmol/L) avec une demi-vie plasmatique chez l'homme de 22 minutes et un volume de distribution de 880 ml/kg [114, 115]. Il semblerait que l'AM soit en premier lieu dégradé par les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 (AM-8-52, AM26-52, AM33-52), suivi en deuxième lieu par les aminopeptidases (AM2-52, AM27-52, AM28-512) [115] [116]. Pour ce qui est de sa clairance plasmatique et de sa biotransformation, ce sont les poumons qui représentent le principal site [117].

Il est possible de détecter l'AM dans la sueur et également au niveau des urines à une concentration six fois plus élevée qu'au niveau plasmatique [118]. Cette forte concentration s'explique par le fait que le rein est lui-même un producteur considérable de ce peptide, mais également par le fait que la voie d'élimination de l'AM et de ses métabolites est rénale. Par

conséquent, l'état de la fonction rénale peut affecter l'élimination et ainsi la pharmacocinétique de l'AM [118].

De plus, l'AM plasmatique existe sous une forme libre, mais également sous une forme liée à une protéine sérique, le facteur H, un inhibiteur de la voie alterne du complément.

## **5.1 Facteur H (FH)**

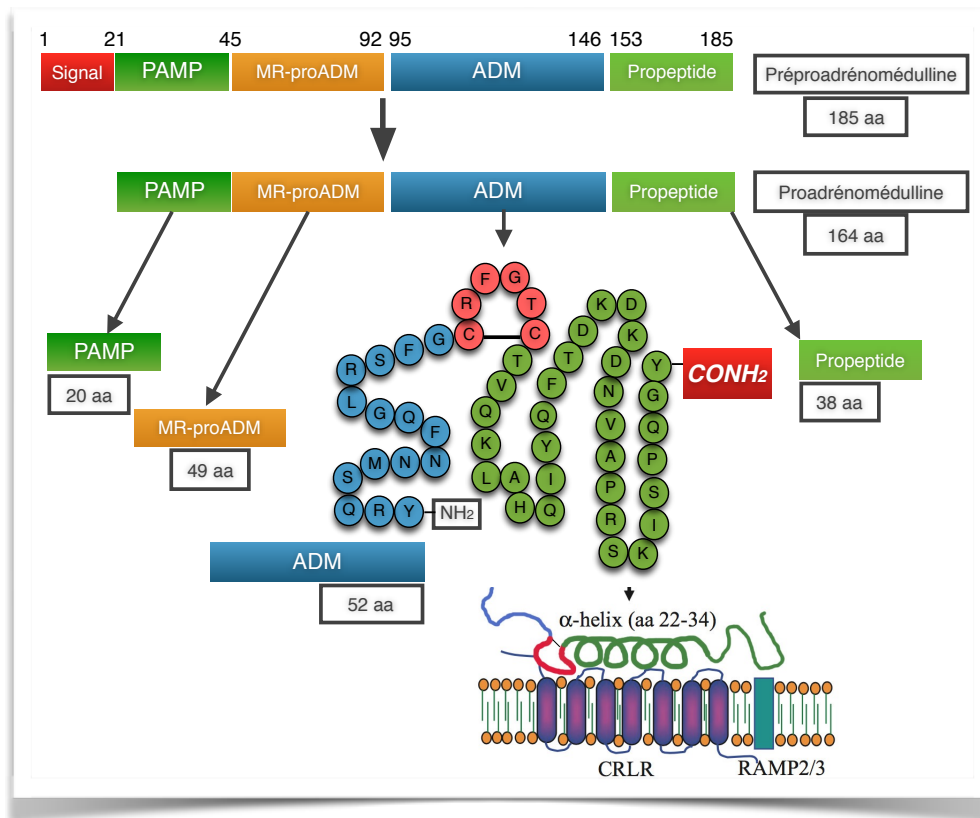
Le système du complément est un des mécanismes de défense contre les infections des plus anciens dans l'évolution. Ce système comporte un ensemble de 35 protéines impliquées dans l'immunité innée et permet de participer activement dans l'élimination des pathogènes. De ces protéines nous retrouvons le facteur H (FH) qui a été révélé pour la première fois il y plus de cinquante ans par Nilsson et Muller-Eberhard [119]. Longtemps étudié pour son rôle dans l'immunité, celui-ci a été également décrit dans les années 2000 comme étant une protéine sérique de transport (l'AMBP1; Adrenomedullin Binding Protein-1) pouvant se lier à l'AM. La liaison de l'AM avec le FH est connue pour avoir un effet important sur l'activité de l'AM [120]. Tout compte fait, certaines études ont réussi à démontrer qu'une coincubation de l'AM et du FH permettait d'augmenter la réponse biologique et de doubler les niveaux de production de l'adénosine monophosphate cyclase (AMPC) dans les fibroblastes [121]. Les auteurs expliquent ce résultat par un possible effet stabilisateur du FH sur la conformation de l'AM ou bien par une augmentation possible des interactions de ce complexe avec la surface cellulaire [121].

De plus, l'AM est très instable en circulation, et ce en raison de la dégradation importante de l'AM par les protéases, principalement par la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP-2) [114]. Toutefois, la présence du FH inhibe le clivage de l'AM par les protéases et permet ainsi d'augmenter l'activité biologique de l'AM. Lors d'études de liaison, seule la forme intacte de

l'AM composée des acides aminés 1-52 a été en mesure de former un complexe avec le FH. Les plus petits segments tels que 13-52 et 1-12 n'ont pas eu la capacité de déplacer l'AM intact (1-52) lors des tests de compétitivité pour le FH [114]. La liaison hydrophobique de l'AM et du FH nécessiterait la présence des résidus tyrosines aux positions 1 et 52 [114].

## 5.2 Synthèse de l'AM

L'AM est un peptide ubiquitaire de 52 acides aminés possédant comme caractéristiques un pont disulfure et une tyrosine amidée en position C-terminale (CONH<sub>2</sub>). Le gène de l'AM est localisé sur le chromosome 11 dans la région p15.1-3 et est composé de 4 exons et 3 introns. Malgré sa longueur, l'AM est un peptide fortement conservé entre les espèces ce qui est le reflet de sa grande importance au niveau physiologique. Il est le fruit de plusieurs clivages enzymatiques successifs illustrés à la figure 26. La préproadrénomédulline (185 aa) est le point de départ de cette cascade. La scission de ce peptide signal aboutira en la création de la proadrénomédulline (proAM) (164 aa). Suite au clivage de celle-ci par des endoprotéases, deux peptides vasoactifs seront libérés (la proadrénomédulline N-terminal 20 -peptide (PAMP) (20 aa) et l'AM (52 aa)) et deux propeptides, dont le midregional proadrénomédulline (MRproAM) (49 aa) qui est dépourvu d'activité biologique [112, 122]. Étant très stable au niveau plasmatique celui-ci constitue un excellent biomarqueur [118, 122]. Il est important de mentionner que dû à un épissage alternatif, deux formes de préproAM seront produites, une conduisant à la formation de AM plus PAMP (cascade décrite ci-haut) et une autre de PAMP seulement. Ceci explique les variations du taux PAMP/AM selon divers tissus. Ces taux pouvant aller de 1-2 % dans le poumon jusqu'à 50 % pour les oreillettes du cœur [122].



**Figure 25. Structure de l'adrénomédulline**

La préproadrénomédulline (185 aa) est le point de départ de cette cascade. La scission de ce peptide signal aboutira en la création de la proadrénomédulline (proAM) (164 aa). Suite au clivage de celle-ci par des endoprotéases, deux peptides vasoactifs seront libérés (la proadrénomédulline N-terminal 20-peptide (PAMP) (20 aa) et l'AM (52 aa)) et deux propeptides, dont le midregional proadrénomédulline (49 aa). Figure dessinée et inspiré de [122, 123]

### 5.2.1 Sécrétion de l'adrénomédulline (AM)

Bien que des niveaux élevés d'AM aient été mesurés dans la médullosurrénale, la plus forte expression d'AM est plutôt associée aux cellules endothéliales qui produisent plus de 20 fois la quantité générée par les cellules adrénomédullaires et 5 fois plus que les cellules musculaires lisses [122]. Outre-les CEs et les CMLs, les leucocytes, les fibroblastes, les cellules stromales du tissu adipeux, ainsi que les macrophages participent activement à la synthèse de

l'AM [124-126]. La production d'AM peut être influencée par des facteurs physiques tels que l'hypoxie, les forces de cisaillement et la tension pariétale ventriculaire, mais également par le genre, le poids et par des facteurs humoraux tels que les cytokines et les hormones endocrines et paracrines [125, 127]. Par conséquent, la concentration plasmatique de l'AM sera perturbée dans certains contextes pathologiques, comme cela est le cas dans l'HTP où l'on voit une élévation des taux d'AM circulant [128, 129].

En outre, il a été démontré dans quelques études que l'AM (MRproAM figure 25) pourrait être un bon biomarqueur dans le diagnostic, mais également dans l'évaluation du pronostic de certaines pathologies telles que la MPOC, la pneumonie aiguë communautaire et le sepsis [118]. En général, les résultats de ces études associaient un dosage plasmatique élevé de l'AM à un mauvais pronostic et à une sévérité de la maladie [130].

Dans le but de résumer l'ensemble des facteurs pouvant affecter la sécrétion de l'AM, voici à la figure 26 une liste exhaustive des divers facteurs stimulant et inhibant la production de l'AM (vert-rouge) ainsi que les pathologies (jaune) pour lesquelles la sécrétion de l'AM est augmentée ou diminuée.

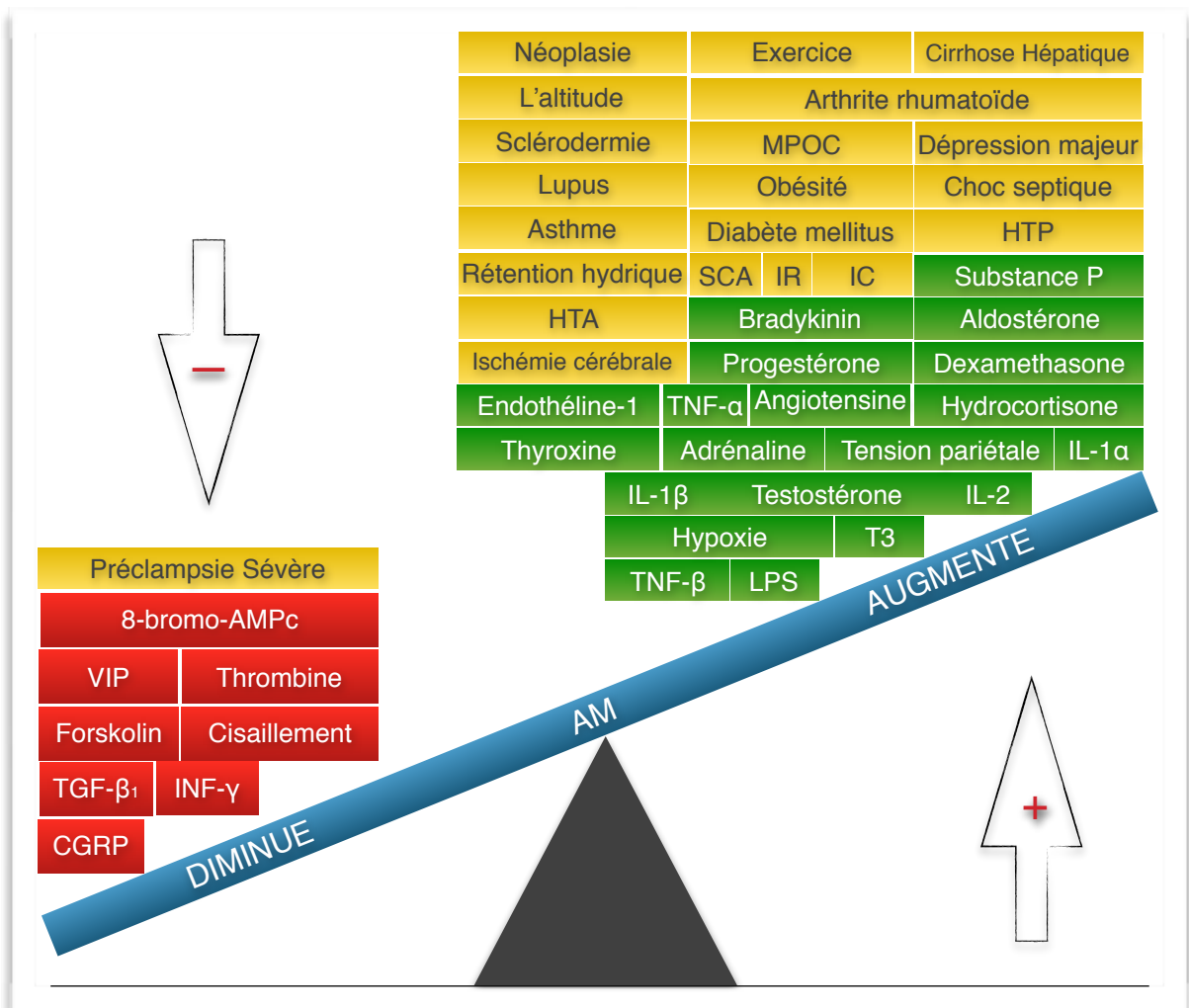


Figure 26. Facteurs stimulant et inhibant la production de l'AM

Liste exhaustive des divers facteurs stimulant et inhibant la production de l'AM (vert↑-rouge↓) ainsi que les pathologies (jaune) pour lesquelles la sécrétion de l'AM est augmentée ou diminuée. VIP (vasoactive intestinal peptide), TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta), INF $\gamma$  (interféron gamma), CGRP (calcitonin gene related peptide), TNF (tumor necrosis factor), LPS (lipopolysaccharide), IL (interleukines), T (triiodothyronine), SCA (syndrome coronarien aigu), IR (insuffisance rénale), IC (insuffisance cardiaque), HTA (Hypertension artérielle), HTP (Hypertension Pulmonaire). Figure dessinée et inspirée de [117, 124, 126, 127, 131-137]

### 5.3 L'activité biologique de l'adrénomédulline (AM)

Son pouvoir hypotenseur réside dans sa capacité à hausser les concentrations de l'AMPc directement au niveau du muscle lisse, mais également par l'augmentation des quantités de NO et EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) au niveau des cellules endothéliales [138] [117]. Outre son action de vasodilatateur, l'AM représente un médiateur multifonctionnel dans la prolifération cellulaire, la perméabilité endothéliale, l'angiogenèse et la régulation hormonale. De plus, l'AM participera à l'homéostasie des fluides et des électrolytes, à la défense immunitaire, à la régulation de l'insuline, à la régulation de la lipolyse et bien plus (Tableau 12). Somme toute, le rôle de ce peptide reste relativement incompris à ce jour en raison de ses activités complexes et parfois même paradoxales. Par exemple, il a été prouvé que l'AM avait à la fois un effet inotrope positif et inotrope négatif, un effet proangiogénique et antiprolifératif et un effet pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. On remarquera également que dans le choc septique, il a été démontré de façon précoce que l'AM permet de maintenir l'homéostasie hémodynamique, mais que dans les phases plus tardives celle-ci favorisera l'hypotension. En général, ces effets paradoxaux sont lieux et temps dépendants. Chez l'humain, au cours des études cliniques de phase précoce, l'administration de l'AM par voie intraveineuse a eu pour bienfait d'améliorer la convalescence lors d'un infarctus du myocarde, de réduire l'apoptose des myocytes, de diminuer la pression artérielle pulmonaire moyenne et d'augmenter la fraction d'éjection chez les personnes souffrantes d'insuffisance cardiaque [139-143]. Toutefois, d'autres études plus poussées seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle physiologique global au sein du système humain.

Tissu / type cellulaire / organe	Fonctions
<b>Plaquettes</b>	Élévation de l'AMPc
<b>Réseau vasculaire</b>	Vasodilatation par l'élévation du NO, de EDHF et de l'AMPc Inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses Pro-Angiogénèse et inhibition de l'apoptose vasculaire Diminue l'hyperperméabilité induite par le peroxyde d'hydrogène et la thrombine
<b>Cœur</b>	Effet inotrope et chronotrope positif Effet inotrope (-) également observé via NO Vasodilatation de l'artère coronaire Inhibition de l'ANP Modulation de l'hypertrophie des cardiomyocytes (cardioprotecteur) Réduction du stress oxydatif vasculaire et cardiaque Protection contre l'inflammation et l'hypertrophie vasculaire Antifibrotique et antioxydant
<b>Rein</b>	Homéostasie des électrolytes et des fluides Modulation de la diurèse et la natriurèse Augmentation de la filtration rénale
<b>Système endocrinien</b>	Augmente la sécrétion de rénine Inhibition de la sécrétion de l'aldostérone, de cortisol et d'ACTH Différenciation du tissu adipeux et régulation de la lipolyse Diminution de la sécrétion d'insuline et augmentation de sa résistance Diminution du stress oxydatif
<b>Système nerveux central</b>	Inhibition de la consommation de sodium Inhibition de la consommation hydrique
<b>Musculosquelettique</b>	Stimulation des ostéoblastes
<b>Système dermatologie</b>	En association avec AMBP-1 diminue le temps de cicatrisation et de guérison d'une plaie
<b>Système hématologique</b>	En association avec AMBP-1, diminution du saignement par la baisse de cytokines pro-inflammatoires Diminution de l'acidose métabolique après hémorragie
<b>Système respiratoire</b>	En aérosol, possède un effet bronchodilatateur
<b>Prolifération cellulaire</b>	Antiprolifératif au niveau des Ces Pro-Angiogénique et pro lymphangiogénique
<b>Système immunitaire</b>	Diminution de la prolifération des fibroblastes Stimulation IL-6 et IL-10 et inhibition IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ et NK- $\kappa\beta$ Effet direct en se liant sur la paroi bactérienne
<b>Système gastro-intestinal</b>	Au niveau de l'estomac, augmentation de la sécrétion en période aiguë de jeûne par le fundus et par le pylore en période chronique
<b>Carcinogénèse</b>	Augmentation de l'angiogénèse stimulée par l'hypoxie et le facteur HIF-1

Tableau 13. Activités biologiques de l'Adrénomédulline. Tableau inspiré de [123, 143-157]



## 5.4 Relation structure et activité

Les études d'activité-structure de l'AM ont été possibles grâce à l'utilisation et la caractérisation d'analogues synthétiques. Le sommaire de ces études et de ces analogues synthétiques est présenté au tableau 14. En résumé, pour obtenir un effet biologique l'AM doit essentiellement être composée de son anneau à 6 résidus et d'une tyrosine amidée en position C-terminale (CONH<sub>2</sub>) [158]. Ces éléments constituent un rôle fondamental dans l'interaction de l'AM avec son récepteur. Ainsi, les fragments AM (13-52) (15-52) (16-52) qui comportent toujours le pont disulfure seront biologiquement actifs. En revanche, contrairement à AM (33-52), l'analogue AM (22-52) dépourvu de l'anneau de 6 résidus pourra se lier aux récepteurs de l'AM, mais agira comme antagoniste [158]. D'un autre côté, par un mécanisme encore inconnu, les analogues constitués que de l'anneau tels que l'AM (11-22) et l'AM (15-22) auront paradoxalement un effet hypertenseur.

**Info PulmoBind :** Les études de structure/activité de l'AM ont guidé la synthèse du PulmoBind. Par conséquent, le PB gardera les acides aminés 22-52, représentant le site de liaison de l'AM, l'anneau de 6 résidus sera remplacé par un PEGG4 et le pont disulfure sera conservé. Pour ce qui sont des résidus 1-15, ils seront troqués pour un térapeptide pour faciliter la liaison avec le  $^{99m}\text{Tc}$ .

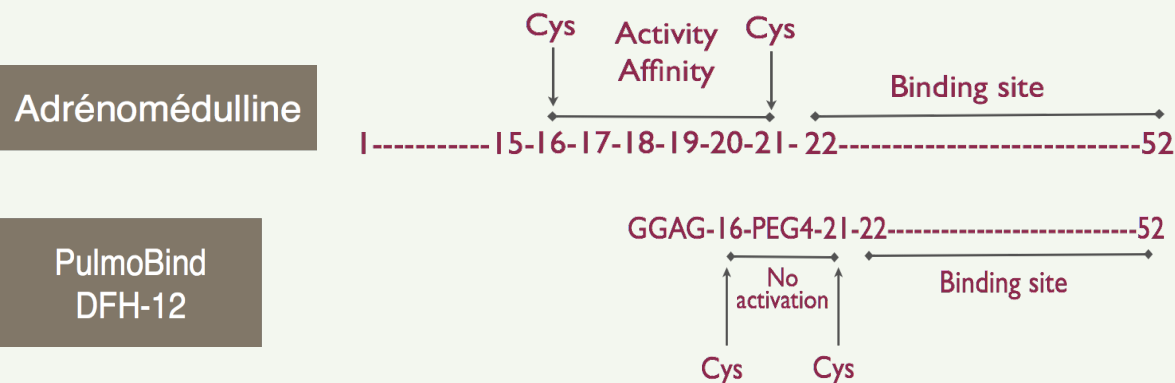


Figure 27. Comparaison des structures de l'adrénomédulline et du PulmoBind

ACIDES AMINÉS #																																																							EC50 µM	AM1	AM2	Hypotenseur	Hypertenseur	Pas d'effet biologique	Commentaires			
AM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52												
AM1-52	Blue															Red			Blue																																			0,03			X							
AM13-52	White												Blue			Red			Blue																																			0,03					X					
AM16-52	White															Red			Blue																																			0,24					X					
AM15-55	White														Blue	Red			Blue																																						X							
AM1-51	Blue															Red			Blue																																			>10					X					
AM1-52-OH	Blue															Red			Blue																																			>10					X					
AM1-51-OH	Blue															Red			Blue																																			>10					X					
AM22-52	White																					Blue																																			>10	+++				X		
AM32-52	White																																	Blue																			>10					X	Pas de liaison au récepteur					
AM1-10-OH	Blue									Yellow	White																																											>10					X	Pas de liaison au récepteur				
AM26-52	White																											Blue																															++				X	
AM30-52	White																												Blue																														(=)	(=)			X	
AM22-43	White																						Blue																																				X					
AM8-52	White							Blue								Red			Blue																																						X							
AM8-52	White										Blue					Red			Blue																																						X							
AM23-52	White																						Blue																																				X					
AM29-52	White																												Blue																															X				
AM11-28	White											Blue				Red			Blue																																						X							
AM11-22	White											Blue				Red			Blue																																						X							
AM15-22	White														Blue	Red			Blue																																						X	Chez le rat, mais pas le chat						
AM1-21	Blue															Red			White																																						X							



## 5.5 Les récepteurs à l'adrénomédulline

Dans les dernières années, les récepteurs associés à la famille de la calcitonine ont suscité un engouement particulier dans l'espoir de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques. Toutefois, la nature complexe de ces récepteurs a eu pour effet de freiner grandement les avancées scientifiques dans ce champ d'études. Néanmoins, nous savons à ce jour que le récepteur à l'AM est un récepteur hétérodimère constitué de deux éléments essentiels: le CLR (Récepteur apparenté au récepteur de la calcitonine) et une protéine chaperonne associée appelée RAMP (Protéine modifiant l'activité du récepteur). C'est lors d'une association avec les protéines chaperonnes RAMP2 et RAMP3 que le récepteur CLR acquiert de l'affinité pour l'AM et formeront respectivement les récepteurs AM1 et AM2 (figure 28, tableau 15) [112].

### 5.5.1 Le CLR

Découvert en 1993, il fut nommé ainsi en raison de sa forte similitude avec le récepteur de la calcitonine (CTR). Avec une homologie de 60 %, ces deux récepteurs (CLR-CTR) sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) possédant 7 domaines transmembranaires et interagissant avec les RAMPs. Contrairement au CTR qui peut s'exprimer seul à la membrane cytoplasmique, le CLR nécessite la co-expression avec les RAMPs pour assurer sa translocation à la surface cellulaire. Il est principalement exprimé au niveau des poumons, des reins et du cœur. De plus, son rôle important a été démontré au sein des souris « knock out » puisque la délétion de celui-ci était létale au niveau embryonnaire [163, 164].

### 5.5.2 Les RAMPs

Les RAMPs représentent une petite famille constituée de trois différentes protéines : RAMP1, RAMP2 et RAMP3. Chacunes d'entre elles possèdent un domaine transmembranaire, un domaine c-terminal intracellulaire (9 aa) et un domaine N-terminal extracellulaire (90-100 aa) qui permettent d'introduire une diversité fonctionnelle lorsqu'elles interagissent avec les RCPGs. Les RAMPs sont en quelque sorte des effecteurs allostériques qui pourront interagir avec les RCPGs pour en changer leur conformation [154, 165]. Ces interactions auront une influence sur l'expression des RCPGs à la surface membranaire, sur l'affinité de ceux-ci pour un ligand et sur les diverses cascades de signalisation intracellulaire (figure 28, tableau 15). Les différents complexes des RAMPs avec le CTR et le CLR ainsi que leurs ligands associés sont représentés au tableau 15. Autres que les récepteurs CLR et CTR, nous savons à ce jour que les RAMPs peuvent interférer avec 9 autres RCPGs. On peut noter leur présence dans la plupart des tissus de l'organisme : le cerveau, les cellules endothéliales, les cellules du système immunitaire, le cœur, le pancréas, les poumons, les reins et même la trachée. Comparativement à la protéine RAMP1 qui ne possède pas de site de glycosylation, les protéines RAMP2 et RAMP3 se démarquent par une présence élevée de ces sites jouant ainsi un rôle probable sur la fonctionnalité des récepteurs avec lesquels ils sont exprimés.

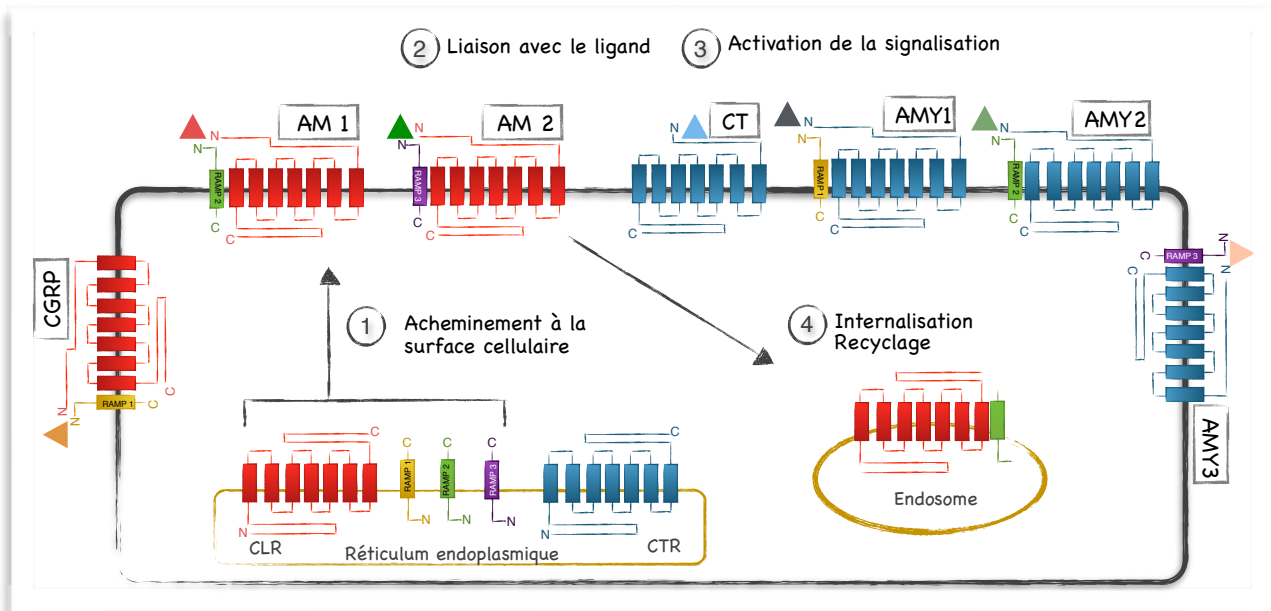


Figure 28. Illustration des récepteurs de la famille de la calcitonine

Cette famille regroupe 6 membres, dont la calcitonine (CT), l'amyline (AMY), deux « calcitonin gene-related peptide »  $\alpha$ CGRP et  $\beta$ CGRP, l'adrénomédulline (AM) et l'adrénomédulline 2 (AM2) que l'on nomme également l'interméline (IMD). Le CLR (rouge), le CTR (bleu) et les RAMPs (jaune, vert et mauve) qui constituent leurs récepteurs vont se retrouver avant toute chose au niveau du réticulum endoplasmique. Au moment opportun, ceux-ci migreront vers la surface cellulaire pour s'exprimer et former différents récepteurs. Les RAMPs agissent et régulent l'activité des RCPGs à 4 niveaux différents. Premièrement, lors de l'acheminement des récepteurs à la surface cellulaire (1), deuxièmement, dans la liaison avec le ligand (2), troisièmement, au niveau de l'activation des voies de signalisation (3) et quatrièmement, ils interviennent dans l'internalisation et le recyclage des récepteurs (4).

Complexe	Nom	Ligand associé
CLR\RAMP 1	CGRP	CGRP > AM
CLR\RAMP 2	AM1	AM >> CGRP
CLR\RAMP 3	AM2	AM = intermédiaire > CGRP
CTR	CTR	CT>>AMY/CGRP
CTR\RAMP1	AMY1	Amy = CGRP > CT
CTR\RAMP2	AMY2	Amy > CGRP/CT
CTR\RAMP3	AMY3	Amy > CGRP/CT

**Tableau 15. Tableau des divers récepteurs de la famille de la calcitonine et leurs ligands associés**

**L'AM possède une affinité pour les récepteurs AM1 et également AM2 où il est en compétition avec l'intermédiaire. Le CGRP est aussi en mesure de se lier à l'AM1, mais avec une moindre affinité en comparaison à l'AM. Tableau inspiré de [112] [165] [123] [122]**

### 5.5.3 Régulation de l'expression

À ce jour, il est encore difficile de bien cibler les facteurs qui peuvent moduler à la hausse ou bien à la baisse l'expression des RAMPs et du CLR. De plus, la densité de ces récepteurs dans les artères pulmonaires au niveau proximal versus distal n'a pas été encore à ce jour bien caractérisée. Néanmoins, nous savons aujourd'hui que:

- L'état hypoxique favorise l'élévation des protéines RAMP2 via l'augmentation de l'HIF-1 (hypoxia inducible factor) [166].
- Le vieillissement a pour effet de diminuer l'expression des RAMP2 [167].
- Dans l'HTAP, le modèle monocrotaline a révélé une diminution significative de l'expression des RAMP2 [60].
- Le genre peut également avoir un impact puisque qu'il a été prouvé que chez les femmes les hormones féminines stimulent l'expression des RAMP2 à la hausse [168]

De toute évidence, nous savons que très peu de chose sur la régulation de ces récepteurs et par conséquent davantage d'études seront nécessaires afin d'éclaircir ce mystère.



# Chapitre 6

## **Le PulmoBind et les données précliniques**

Lors du dépôt initial du projet pour une demande d'essai clinique à Santé Canada, plusieurs années d'études précliniques s'étaient écoulées. Durant cette période, le laboratoire a tenté de démontrer l'efficacité, ainsi que l'innocuité du PB à l'aide d'expérimentations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ces travaux ont déjà fait l'objet de publications, toutefois voici un résumé de ceux-ci.

### **6.1 PulmoBind et la pureté**

La qualité de synthèse d'un produit pharmaceutique est un élément important pour les instances réglementaires. Par conséquent, des tests d'assurance qualité ont été effectués par un laboratoire indépendant, par notre groupe de travail ainsi que par le département de microbiologie de l'Institut de Cardiologie de Montréal. En résumé, la synthèse du PB a révélé une pureté radiochimique de plus de 95 % avec une stabilité pouvant aller jusqu'à 5 jours en solution [61]. Les études de microbiologie sur la solution finale pour l'injection intraveineuse ont démontré une absence d'éléments pyrogènes confirmant ainsi notre capacité à livrer un produit synthétisé sécuritaire et acceptable pour l'utilisation humaine.

### **6.2 Les études d'affinité avec le récepteur de l'AM**

La caractérisation de l'affinité du PB pour les récepteurs à l'AM était essentielle pour déterminer la spécificité de liaison. Pour ce faire, des essais de liaison ont été réalisés sur des préparations d'homogénat de tissus pulmonaires canins et sur la ligne cellulaire humaine MCF-7. En résumé, au moment de ces essais, lorsque comparée avec l'AM (1-51) le PB a démontré un Bmax (Bind maximal) plus élevé ce qui se traduit par une capacité supérieure à occuper une plus

grande proportion des sites de liaison disponibles, mais avec une affinité moindre[61]. Quant aux expériences de liaison compétitive du PB et de l'AM (1 - 51) avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -PB, ils ont généré des courbes de déplacement semblable suggérant ainsi l'absence d'un autre site de liaison distinct pour le PB[61]. Au niveau des cellules MCF-7, l'évaluation du PB et de sa constante de dissociation (Kd) s'est avérée similaire à celle de la valeur déjà rapportée dans la littérature pour l'AM dans cette même lignée soit 4nM [169].

### **6.3 Les études de biodistribution chez l'animal**

En 2005, dans notre laboratoire, des études sur la biodistribution de l'AM avaient démontré que le poumon était le premier site de clairance de l'AM avec une importante captation lors d'un premier passage. Il en découla l'hypothèse que le poumon ne faisait pas que moduler les taux circulants de l'AM, mais que celui-ci représentait probablement la cible physiologique première [170]. Pour vérifier une potentielle différence avec l'AM, la clairance plasmatique propre au PB a été évaluée chez le chien et le rat. Au sein de ces deux modèles, la captation pulmonaire s'est avérée très élevée au premier passage favorisant ainsi une clairance rapide et un temps de demi-vie plasmatique court [171]. La voie d'élimination du PB est majoritairement urinaire, mais également hépatique en plus faible proportion [60]. En plus de la captation rapide du PB au niveau pulmonaire, sa rétention est prolongée (4 heures chez l'animal), permettant ainsi une bonne fenêtre de temps pour effectuer l'imagerie. D'autre part, moins de 1 % de l'activité totale du PB administrée a été détectée au niveau de cœur, de la rate, de la thyroïde, du colon, du petit intestin et du duodénum démontrant une certaine spécificité lors d'études chez le rat [60, 171].

## 6.4 Évaluation de la dosimétrie chez l'animal

Avant de déterminer un dosage officiel pour les essais cliniques, il a été important d'évaluer à diverses concentrations l'impact du PB marqué sur la dose absorbée de radiation dans le but de produire une solution injectable la plus sécuritaire possible. Cette estimation de la dosimétrie a été réalisée dans un modèle canin (n=5 femelles) en injectant des doses de radiation allant de 185 à 555 MBq. La dose efficace obtenue après calcul (1,7-5,2 mSv chez la chienne) se classait largement dans les normes [61]. En effet, ces résultats sont comparables aux tests que nous retrouvons en médecine nucléaire actuellement qui se situent entre 0,2-14mSv [61]. Suite à divers analyses, la dose sécuritaire pour la phase I de recherche clinique s'est arrêtée sur celle de 15 mCi (555 MBq). À noter que cette dose représente le « lung scan dose (LSD) », par conséquent 15mCi = LSD.

## 6.5 Évaluation de la sécurité hémodynamique chez l'animal

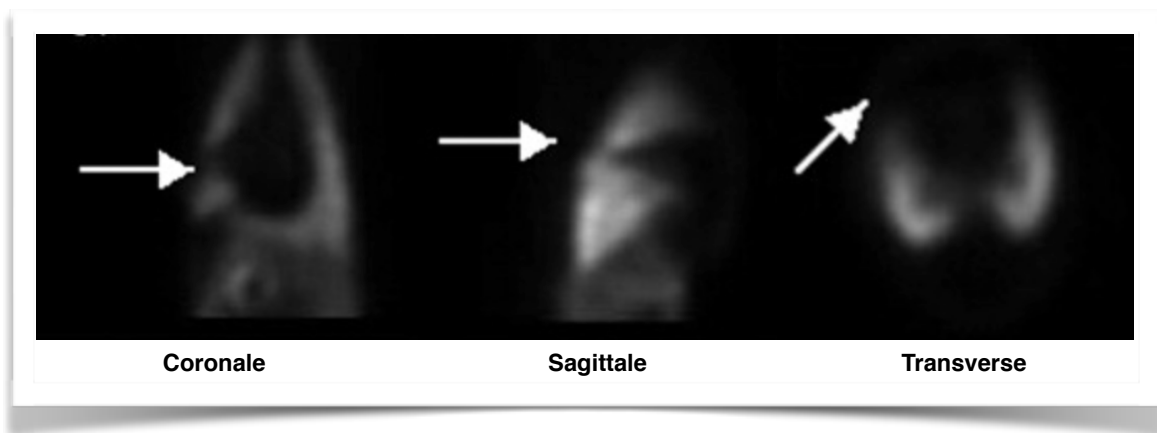
Du fait que la structure du PB possède une grande similitude avec celle de l'AM, un peptide vasodilatateur, il était incontournable d'évaluer l'incidence de l'administration du PB sur les paramètres hémodynamiques. Chez le chien, l'injection d'une simple dose équivalente à 37 fois le LSD n'a produit aucun effet mesurable. Toutefois, lorsqu'administré à une dose de 87 fois le LSD, il a été possible d'observer une diminution modeste et transitoire de la PAPm. Des essais de même nature chez le rat n'ont généré aucun impact hémodynamique, et ce même à des doses allant jusqu'à 170 fois du LSD. Par conséquent, la présence de cette large fenêtre de sécurité permet d'affirmer que le PB est un agent d'imagerie sécuritaire hémodynamiquement. Par ailleurs, l'administration de doses répétées (3 x 100 fois le LSD) n'a également causé aucune toxicité au niveau neurologique, comportemental, hématologique, biochimique et ni au niveau de la coagulation.

## 6.6 Les tests précliniques supplémentaires

Des tests effectués en immunologie ont permis d'établir le caractère non immunogène et non lymphoprolifératif du PB. De plus, les tests locaux en cas d'extravasation non pas démontré de réaction au sein du tissu mou et des muscles.

## 6.7 L'efficacité

En plus de l'innocuité du PB discutée dans ce chapitre, l'intérêt de poursuivre le développement pharmaceutique en phase I repose essentiellement sur l'efficacité du PB dans les études précliques. En effet, ces études *in vivo* ont su démontrer dans deux modèles animaux de l'HTAP (monocrotaline et hypoxie Sugen) une diminution significative de la captation du PB chez les rats hypertendus comparativement aux groupes contrôles. D'autre part, des essais chez des chiens ayant subi une ligature régionale de l'arbre vasculaire pulmonaire ont démontré la capacité du PB à imager les déficits perfusionnels (figure 29). Par conséquent, ces résultats démontrent le potentiel diagnostique du PB dans la pathologie de l'embolie pulmonaire.



**Figure 29. Déficit perfusionnel visualisé dans les plans coronale, saggitale et transverse suite à l'injection du PB chez un chien ayant subi une ligature vasculaire au niveau pulmonaire**

## **6.8 Conclusion**

À la lumière de la théorie présentée et de l'ensemble des études précliniques effectuées, une demande d'essai clinique a été soumise et une lettre de non-objection de Santé Canada fut obtenue. La phase clinique du PB a ainsi débuté et par le fait même le cœur du sujet de mon doctorat a pris forme. Ils seront aussi présentés dans les prochaines sections l'hypothèse et les objectifs de ce doctorat, les deux articles publiés des journaux EJNMMI et Molecular Imaging, la discussion et finalement la conclusion.

# Chapitre 7

## Hypothèse de l'étude

L'AM marquée pourra chez l'homme de façon efficace, sécuritaire et non invasive permettre l'imagerie moléculaire de la circulation pulmonaire et la détection des divers gradients perfusionnels.

### 7.1 Objectifs de l'étude :

#### 7.1.1 Évaluation de la Sécurité

- Déterminer chez l'humain en bonne santé la pharmacocinétique et la biodistribution du PulmoBind.
- Déterminer l'impact chez le sujet sain de l'administration du PulmoBind sur les doses de radiations absorbées en évaluant sa dosimétrie.
- Évaluer chez le sujet sain les impacts potentiels du PulmoBind sur les signes vitaux, l'ECG, les paramètres hématologiques et biochimiques, et ce sur une période s'étalant jusqu'à 51 heures post injection.
- Évaluer et relever chez le sujet sain tous les événements indésirables locaux et systémiques sur une période allant jusqu'à 30 jours post injection chez le sujet sain.

#### 7.1.2 Efficacité

- Évaluation chez le sujet sain de la capacité du PulmoBind à fournir des images de qualité de la circulation pulmonaire et des gradients perfusionnels par TEMP.



### **7.1.3 Détermination de la dose optimale**

- Déterminer la dose optimale en évaluant la sécurité et l'efficacité du PulmoBind dans trois groupes à des doses distinctes.

# Chapitre 8

## Article #1

Harel, François; Levac, Xavier; Nguyen, Quang T; Létourneau, Myriam; Marcil, Sophie; Finnerty, Vincent; Cossette, Marieve; Fournier, Alain; Dupuis, Jocelyn (2015). *Molecular imaging of the human pulmonary vascular endothelium using an adrenomedullin receptor ligand*, *Molecular Imaging*, vol. 14 :1-9.

# Article 1 Safety of PulmoBind for molecular imaging of the human pulmonary circulation

François Harel, Xavier Levac, Quang T. Nguyen, Myriam Letourneau, Sophie Marcil, Vincent Finnerty, Mariève Cossette, Alain Fournier, and Jocelyn Dupuis

---

F. Harel; X. Levac; Q.T. Nguyen; S. Marcil; V. Finnerty; J. Dupuis (\*)

Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada Tel.: 514-376-3330 ext. 3542, Fax: 514-376-1355.

F. Harel

Department of Nuclear Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

X. Levac; J. Dupuis

Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

M. Letourneau; A. Fournier

INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Quebec, Canada

M. Cossette

Montreal Heart Institute Coordinating Center, Montreal, Quebec, Canada

## List of Online Resource Files

ESM 1 contains: Supplementary Data (Inclusion-Exclusion Criteria);

Supplementary Figures 1 (Study Timeline), and 2 (Study Adverse Events);

and Supplementary Video Legends.

ESM 2 is the Video 1.

ESM 3 is the Video 2.

## 8.1 Abstract

**Purpose:** This phase I study (NCT01539889) evaluated the safety, efficacy and dosing of PulmoBind for molecular imaging of the pulmonary circulation. Adrenomedullin receptors are abundantly distributed in lung capillaries. We developed an adrenomedullin derivative called PulmoBind. Labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ , it allows SPECT imaging of lung perfusion. In pre-clinical studies, PulmoBind scans enabled detection of lung perfusion defects and quantification of microcirculatory occlusion caused by pulmonary hypertension.

**Methods:** Healthy humans (n = 20) were included into escalating groups of 5 mCi (n = 5), 10 mCi (n = 5) or 15 mCi (n = 10)  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind. SPECT imaging was serially performed and  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind dosimetric analysis accomplished.

**Results:** Radiochemical purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind was greater than 95%. There were no safety concerns at the 3-dosages studied. Imaging revealed predominant and prolonged lung uptake with mean peak extraction of  $58\% \pm 7\%$ . PulmoBind was well tolerated with no clinically significant adverse event related to study drug. The highest dose of 15 mCi provided a favorable dosimetric profile and excellent imaging. The postural lung perfusion gradient was detectable.

**Conclusions:**  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind is safe and provides good quality lung perfusion imaging. The safety/efficacy of this agent can be tested in disorders of the pulmonary circulation such as pulmonary arterial hypertension.

**Keywords:** lung ▪ molecular imaging ▪ peptides ▪ radioisotopes ▪ single-photon emission computed tomography ▪

## 8.2 Introduction

Adrenomedullin is a 52 amino-acid multifunctional regulatory peptide expressed in a wide range of tissues including the lungs [172-174]. Its specific heterodimeric receptor is composed of the calcitonin like receptor (CLR) and the receptor activity-modifying protein 2 or 3 (RAMP2, RAMP3) [[175]]. The receptor is abundantly expressed in human alveolar capillaries and mostly distributed at the surface of the endothelium [11, 176-178]. Accordingly, the lungs contain adrenomedullin binding sites at a density higher than any other organ studied [178]. Previous studies determined that the lungs are a primary site for plasma adrenomedullin clearance [9[179]. Based on this evidence, we hypothesised that radiolabelled adrenomedullin derivatives could be used as non-invasive imaging tracers to evaluate the integrity of the pulmonary circulation. Through rational design and structure-activity studies we developed various adrenomedullin derivatives [62] that would maintain binding affinity without significant biologic effects at the lung scan dose, while enabling the addition of a chelating moiety for a suitable radioisotope [180]. These derivatives demonstrated good quality lung imaging enabling the detection of large perfusion defects mimicking pulmonary embolism [171], but also microcirculatory occlusion in the monocrotaline model of pulmonary arterial hypertension [60]. A lead compound possessing the desired properties was developed [180] and called PulmoBind. In pre-clinical studies, PulmoBind displays all of the desired qualities for a molecular imaging agent in nuclear medicine: important first pass and prolonged uptake by the lungs and quick plasma clearance with elimination by the liver and kidneys [180]. This Phase I trial tested the safety and efficacy of PulmoBind.

### 8.3 Methods

The trial was conducted at the Montreal Heart Institute and registered at Clinicaltrials.gov (NCT01539889).

PulmoBind synthesis was performed as previously described in details [[180]]. Mean purity of drug substance was 98.95%. Uni-dose vials were prepared containing 18.5 µg of lyophilised PulmoBind. The labeling procedure was performed by addition of 20 µl acetate buffer (1 M, pH 5.5), 200µl Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 M, pH 12), 31.25 µl SnCl<sub>2</sub> (0.8 mg/ml in HCl 0.05M) and 30 mCi of Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (28.9 pmol). Finally, 1 ml of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1M, pH 4.5) was added to adjust pH. <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind was purified using a C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridge, passed through a 0.2 µm filter and diluted with physiological saline to a final volume of 10 ml. Radiochemical purity was tested by instant thin layer chromatography.

There were three study objectives: Safety, efficacy and dosing. A safety objective aimed to determine pharmacokinetics and biodistribution to perform dosimetric evaluation; another safety objective was to evaluate any effect on vital signs and on hematology and biochemistry profiles; and to evaluate any local or systemic reactions. The efficacy objective was to evaluate the ability of PulmoBind to allow lung perfusion imaging in human. The third objective determined the optimal dose by evaluating the safety/efficacy in three groups with escalating dosages.

## Study design and safety assessments

Healthy subjects (n = 20) were recruited. Detailed inclusion and exclusion criteria are in the supplementary data (Online Resource 1).

The study timeline is shown in Supplementary Figure 1 (Online Resource 1). Study subjects were divided into 3 groups receiving increasing dosage of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind: Group A, 5 mCi (185 MBq, n = 5); Group B, 10 mCi (370 MBq, n = 5) and Group C, 15 mCi (555 MBq, n = 10).  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind was intravenously injected over 3-min using a mini-perfusion pump and study procedures were performed according to Figure 1.

All adverse events occurring during the study were reported and characterized. Vital signs were measured at screening, on day-1 (pre-injection, 1-min, 2-min, 3-min, 5-min, 15-min, 30-min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h), day-2 and day-3. ECGs, hematology and biochemistry laboratories were obtained at screening, visit 2 and 3. Urine and blood samples were collected over 24 h and feces over 48 h to determine radioactivity.

Dosimetry calculations were performed as follows. A transmission scan was performed to obtain an attenuation map using a  $^{57}\text{Co}$  flood source. Whole body scans were then obtained 35, 60, 120, 240, 360 and 1620 minutes after injection (Figure 1) with a dual-head e-cam (Siemens Medical Systems) using a low-energy high-resolution collimator with 256 x 1024 matrices. Acquisitions were evaluated with MATLAB version 7.01. Regions of interest were drawn over the most visible organs from anterior and posterior projections. Background noise was removed from each organ's region of interest. The geometric mean of anterior and posterior view images was used to calculate the estimated  $^{99m}\text{Tc}$  total count and mean counts dose, in counts per minute, for the organ.

A regression model (“double exponential” or “gamma variate” depending on the organ) was applied. Collected urine and stool values were added to the biodistribution calculation for the bladder and intestines, respectively, to model a “closed system”. Activity in the rest of the body or “residual cumulative dose” was estimated by the theoretical total cumulative dose for  $^{99m}\text{Tc}$ , less the cumulative dose of all the other organs. The final cumulative dose for the bladder was re-calculated in OLINDA/EXM 1.0 software (Organ Level Internal Dose Assessment Code) with the “voiding bladder model” using a voiding interval of 2 and 4.8 h. Percentage of the total dose in the feces was used to calculate the cumulative doses of the different parts of the digestive system with the International Commission on Radiological Protection gastrointestinal model provided in the OLINDA/EXM software. The dose to the ovaries was estimated from biodistribution measured in males, but applied to a female model.

Blood samples (6 ml) were obtained at times 0, 1, 3, 5, 15, 60, 120, 180, 240, 300, 360 and 1620 min to determine plasma kinetics of PulmoBind. Kinetic analysis was performed using a 2-phase exponential-decay equation with GraphPad Prism version 6.0 software.

$$Y = \text{Span1} \cdot e^{-k1 \cdot X} + \text{Span2} \cdot e^{-k2 \cdot X} + \text{Plateau}$$

For precise quantification of pulmonary clearance of PulmoBind, we performed a dynamic acquisition of the chest for 20 min following injection (Figure 1) coupled with whole body images later in time.

Lung imaging quality was determined by 2 nuclear medicine specialists from whole body image acquisitions. They graded the scans from I (mediocre) to IV (superior quality). Quality was judged in relation with that usually achieved with radiolabeled albumin macroaggregates lung perfusion scan based on the investigator’s judgment.



## Statistical analysis

Analysis was performed by the Montreal Heart Institute Coordinating Center. Analysis was performed for the three study groups combined and for each separately. Adrenomedullin, the parent PulmoBind compound, is a pharmacologic vasodilator. Therefore, the sample size estimation was based on blood pressure variation. Blood pressure measured in 1743 Canadian individuals of the World Heart Organization MONICA project was  $121 \pm 16$  mmHg (mean  $\pm$  SD) for systolic and  $78 \pm 11$  mmHg for diastolic [[181]]. Based on these values and assuming a pre- post-systolic blood pressure correlation of 0.5, a sample size of 20 (whole study group) allowed the detection of a reduction of 12 mmHg in systolic blood pressure (-10%) with a power of 90% and an alpha of 0.05. For a sample size of  $n = 10$  (group C, 15 mCi) the power to detect a reduction of 18 mmHg (-15%) was 90%. For a sample size of  $n = 5$  (group A, 5 mCi; and group B, 10 mCi) the power to detect a reduction of 24 mmHg (-20%) was 80%.

The safety parameters statistical analysis was performed using SAS Version 9.2. The maximum reduction in vital signs from visit 1 (pre-injection) to 360 min was calculated and analysed using an ANOVA model with study group as main factor. Under this model, the mean maximum reduction in the three study groups combined and in each group separately was estimated and presented with a 95% confidence interval (CI). In addition, vital signs at Day 1 (pre-injection), 1 min, 2 min, 3 min (during injection), 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h and 6h were analysed using a repeated measures ANOVA model including study group, time and study group X time interaction as main factors. Under this model, differences from Day 1 (pre-injection) to each follow-up time point were estimated and presented with a 95% CI. Oral temperature, hematology and biochemistry parameters were analysed using a repeated measures ANOVA model including study group, time and study group-X-time interaction as main factors. The focus of these analyses

is on showing that the bounds of the 95% CI of the change over time and maximum reduction are within acceptable limits. Due to too low power and small sample size, adverse events, categorical safety parameters and efficacy endpoint of lung perfusion are simply tabulated. Values are reported as mean  $\pm$  SD or as mean (95% CI).

## 8.4 Results

Two women and 18 men were recruited. Mean age was  $33 \pm 14$  years (range 20-71 years) and mean weight was  $75 \pm 14$  kg. A single lot of PulmoBind was used for the study. Mean drug substance purity assessed by HPLC analysis and MALDI-ToF MS was 98.95%. The radiochemical purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind was  $95.3 \pm 3.7\%$ . The estimated specific activity injected was  $\sim 0.94$  mCi/ $\mu\text{g}$ . All subjects were included into the safety analysis. In 1 subject, the injected  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind showed prolonged forearm vein retention of the tracer due to an anomalous venous return (non-connecting veins). This subject was therefore not included in the plasma kinetic and biodistribution analysis.

Plasma kinetics of PulmoBind are shown in Figure 2. Plasma levels rapidly decreased with distribution half-life of 6 min (CI, 4-12) and elimination half-life of 90 min (CI, 65-149).

Biodistribution was analysed for the whole study groups combined (n=19).  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind was rapidly retained by the lungs with a peak uptake of  $58\% \pm 7\%$  ID occurring  $5.5 \pm 0.7$  minutes following injection. Lung activity decayed very slowly with  $44\% \pm 6\%$  ID after 35 minutes and  $33\% \pm 5\%$  ID after 60 min. Whole body imaging in anterior and posterior views with the lung activity-time curve of a study subject is shown in Figure 3. A video demonstrating dynamic  $^{99m}\text{Tc}$ -

PulmoBind lung uptake and body biodistribution over 6 h is shown in the Video 1 (Online Resource 2 and 1).

Organs biodistribution is shown in Figure 4. Early after injection, the majority of the tracer is retained by the lungs, followed in importance by the kidneys and the liver. Increased urinary, gallbladder and bowels activity with time confirms the urinary and liver elimination. Tomographic imaging 90 minutes after injection is shown in Figure 5. There is still substantial lung activity and, interestingly, higher activity is evident in the more gravity-dependent (dorsal) regions of the lung. This figure also demonstrates kidneys, liver and gallbladder activity as the tracer is eliminated. A 360° animation is shown in the Video 2 (Online Resource 3 and 1).

### **Safety parameters and imaging quality**

Since PulmoBind is derived from adrenomedullin, a hypotensive peptide, sample size was estimated to detect a variation of 12 mmHg for the whole study group (n = 20), 24 mmHg in the 5 mCi and 10 mCi groups (n = 5), and 18 mmHg in the 15 mCi group (n = 10). These values are also deemed clinically significant.

For the 20 subjects, the maximum reduction in blood pressure (mmHg) for Day 1, from pre-injection to 6h, is -7.4 mmHg (-10.3, -4.4) (mean with 95% CI) for systolic blood pressure and -9.8 mmHg (-13.4, -6.2) for diastolic blood pressure. Mean systolic and diastolic blood pressures measured throughout the study for the 20 subjects are presented in Figure 6. The change in systolic and diastolic pressures compared to pre-injection values is also depicted. The dotted lines represent a 12 mmHg variation, considered to be clinically significant. Table 1 shows the maximum

reduction of systolic and diastolic blood pressure (irrespective of its time point) and the confidence interval for each study group. There were no clinically significant changes in blood pressure.

Similarly, there were no significant variations in heart rate, respiratory rate, oxygen saturation and body temperature (data not shown). Biochemistry and hematology safety laboratories remained within the normal clinical range.

Activity-time curves for subjects receiving the nominal dose of 15 mCi of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind are presented in Figure 4. About 97% of the cumulative dose can be predicted from the organs modeling. The radiation dose absorbed by target organs and the total body are shown in Table 2.

There were no serious adverse events. The frequency, relationship to study drug and intensity of non-serious events are shown in the Supplementary Figure 2 (Online Resource 1). There were no events definitely related to study drug. There was 1 non-serious event probably related to study drug as a subject experienced mild pain at the injection site.

Imaging quality is shown in Figure 7. At the dosage of 15 mCi (555 MBq), a substantial proportion of subject showed superior quality at both 35 min (60%) and 60 min (30%) following injection.

## 8.5 Discussion

PulmoBind was developed through rational design and structure-activity studies to specifically and safely image the pulmonary circulation by binding to the adrenomedullin receptor [[180]]. Adrenomedullin is a 52 amino-acid peptide possessing various biologic effects, among them vasodilation. Adrenomedullin may be involved in pulmonary hypertension and its chronic administration in animal models resulted in therapeutic improvement [182]. The lung is a primary site for plasma adrenomedullin clearance [170] and displays a high density of receptors, mostly in alveolar capillaries [176]. Using labeled derivatives we demonstrated specific and important lung uptake after intravenous injection [[62]]. Furthermore, we demonstrated that labeled adrenomedullin derivatives could image large lung perfusion defects mimicking pulmonary embolism as well as small pulmonary vessel obliteration in the monocrotaline model of pulmonary arterial hypertension [60, 171]. In the latter, there is also reduced pulmonary expression of the receptor. Although human pathologic data demonstrated important distribution of adrenomedullin binding sites in the capillaries, this is the first *in vivo* demonstration that the human lung represents a primary site for circulating adrenomedullin clearance. The lung uptake is prolonged suggesting that the tracer may irreversibly bind to its receptor to be later internalised. Previous data in dogs was also suggestive since there was no detectable return of ligand, within a pulmonary transit time [171]. The current study therefore validates the adrenomedullin receptor as an appealing target to non-invasively probe the integrity of the pulmonary circulation in human.

The maximal dose of  $^{99m}\text{Tc-PulmoBind}$  used in the current study (15 mCi) contained a maximum of 18.5  $\mu\text{g}$  of peptide. This dosage did not cause any clinically significant hemodynamic effect. There were no variations of blood pressure outside to the predetermined clinically significant

range. The structure of PulmoBind was indeed designed to reduce any potential hypotensive effects by substituting the 4 amino acids contained within its 2 cystine residues by a 4-unit polyethylene glycol spacer [180]. This approach provided a great safety margin as injection of PulmoBind does not cause any detectable hemodynamic effects at up to 170X the lung scan dose in rats (PulmoBind investigator's brochure).

The dosimetry for patients selected for the nominal dose of 15 mCi reveals an effective dose of approximately 6 to 8 mSv. The liver and the kidneys rapidly eliminate the activity. By comparison, the absorbed dose is similar to SPECT myocardial scintigraphy, a commonly used diagnostic test. At the dosage of 15 mCi, <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind provided lung scans that were judged of superior quality compared to what is generally obtained by labeled albumin macro-aggregates. Albumin macro-aggregates injections are composed of particles generally varying in size from 10 μm to 70 μm. The number of particles injected varies but is generally around 350,000 per injection. These particles will therefore block alveolar capillaries, but also larger pre-capillary vessels. By contrast, <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind does not block vessels but binds to the vascular endothelial cells expressing its receptors. Since the greatest vascular surface area resides in the alveolar capillaries, where intense adrenomedullin binding has previously been observed in human lungs [[176]], use of the molecular agent PulmoBind may provide superior imaging. Interestingly, the normal dorsoventral postural perfusion gradient was also easily detectable demonstrating that PulmoBind distributes according to blood flow.

Numerous disorders can affect the physical and biologic integrity of the pulmonary circulation. Unfortunately, there is currently no non-invasive method to directly probe the status of the pulmonary circulation. The pulmonary capillaries represent a very large metabolically active vascular surface area. Future trials are necessary to determine if clinical conditions that affect the

distribution, the density and/or the activity of the adrenomedullin receptor may be evaluated using PulmoBind. More specifically, PulmoBind could be evaluated as a non-invasive test to image pulmonary arterial hypertension, a condition associated with endothelial dysfunction and loss of pulmonary microcirculation.

## **8.6 Conclusion**

This phase I study assessed the safety and efficacy of PulmoBind, a novel lung molecular imaging agent designed to non-invasively evaluate the pulmonary circulation. In this first-in-human trial, there were no safety concerns and PulmoBind provided very good quality lung imaging. This novel molecular imaging agent should now be tested in disorders of the pulmonary circulation.



## **Acknowledgments**

This work was supported by the Quebec Consortium for Drug Discovery. The authors would like to thank Emma Dedelis and Hubert Poiffaut for their technical assistance and Luc Harvey and Lucette Whittom for their help with the study protocol and case report forms.

## **Funding**

This work was supported by the Quebec Consortium for Drug Discovery.

## **Ethical Standards**

The study has been approved by the institutional review board and has therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All subjects signed a written informed consent form prior to their inclusion in the study.

## **Conflict of Interest**

Dr. Dupuis is a shareholder of PulmoScience Inc. The other authors report no conflicts.

## **FIGURE LEGENDS**

**Fig. 1** Nuclear medicine imaging protocol

**Fig. 2** Plasma kinetics of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind in humans

**Fig. 3** Whole body planar SPECT imaging in a human (subject 006) 60 min after injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind (**A**) and activity-time curve for lung activity of the tracer (**B**)

**Fig. 4 (A)** Organs biodistribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind at various time points after injection for all study groups combined (n=19). **(B)** Activity-time curves in organs of 9 subjects receiving 15 mCi (555 MBq) of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind. Values are mean  $\pm$  SD

**Fig. 5** Tomographic SPECT imaging of the lungs 90 min after  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind injection in human in transversal (**A**), sagittal (**B**) and frontal (**D**) views. There is greater activity in the gravity-dependent (dorsal) regions of the lungs. 3D reconstruction is shown in (**C**)

**Fig. 6** Effect of PulmoBind on systemic blood pressure of all study groups (n = 20). Graph (**A**) represents mean systolic and diastolic blood pressures. Variation of systolic (**B**) and diastolic (**C**) blood pressure compared to pre-injection values. The dotted lines represent a 12 mmHg difference pre-determined to be clinically significant

**Fig. 7** Imaging quality at dosages of 5 mCi (185 MBq, n = 5), 10 mCi (370 MBq, n = 5) and 15 mCi (555 MBq, n = 9)  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind at various time points after injection

**Table 1** Mean maximum reduction per study group for systolic and diastolic pressures

	Group	Maximum reduction	95 % CI
Systolic blood pressure (mmHg)	5 mCi*	-17.2	(-23.0, -11.4)
	10 mCi†	-3.6	(-9.4, 2.2)
	15 mCi‡	-4.3	(-8.4, -0.2)
Diastolic blood pressure (mmHg)	5 mCi*	-11.4	(-18.7, -4.1)
	10 mCi†	-7.8	(-15.1, -0.5)
	15 mCi‡	-10	(-15.1, -4.9)

\*(185 MBq), †(370 MBq), ‡(555 MBq).

**Table 2** Absorbed radiation after <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind

<i>Target organ</i>	<i>Equivalent dose (mSv/555MBq)</i>
Gallbladder	25.25
Kidneys	23.60
Lungs	8.01
Liver	3.97
Spleen	2.37
Bladder	
2.0 h void	12.08
4.8 h void	28.29
Testicles	
2.0 h void	0.58
4.8 h void	1.02
Ovaries*	
2.0 h void	6.60
4.8 h void	7.48
<b>Total body</b>	<b>Effective Dose (mSv/555MBq)</b>
Man 2.0 h void	5.58
Man 4.8 h void	6.45
Woman 2.0 h void	6.81
Woman 4.8 h void	7.68

\*Dose to the ovaries is estimated from male biodistribution applied to a female dosimetry model.

Figure 1. Nuclear medicine imaging protocol

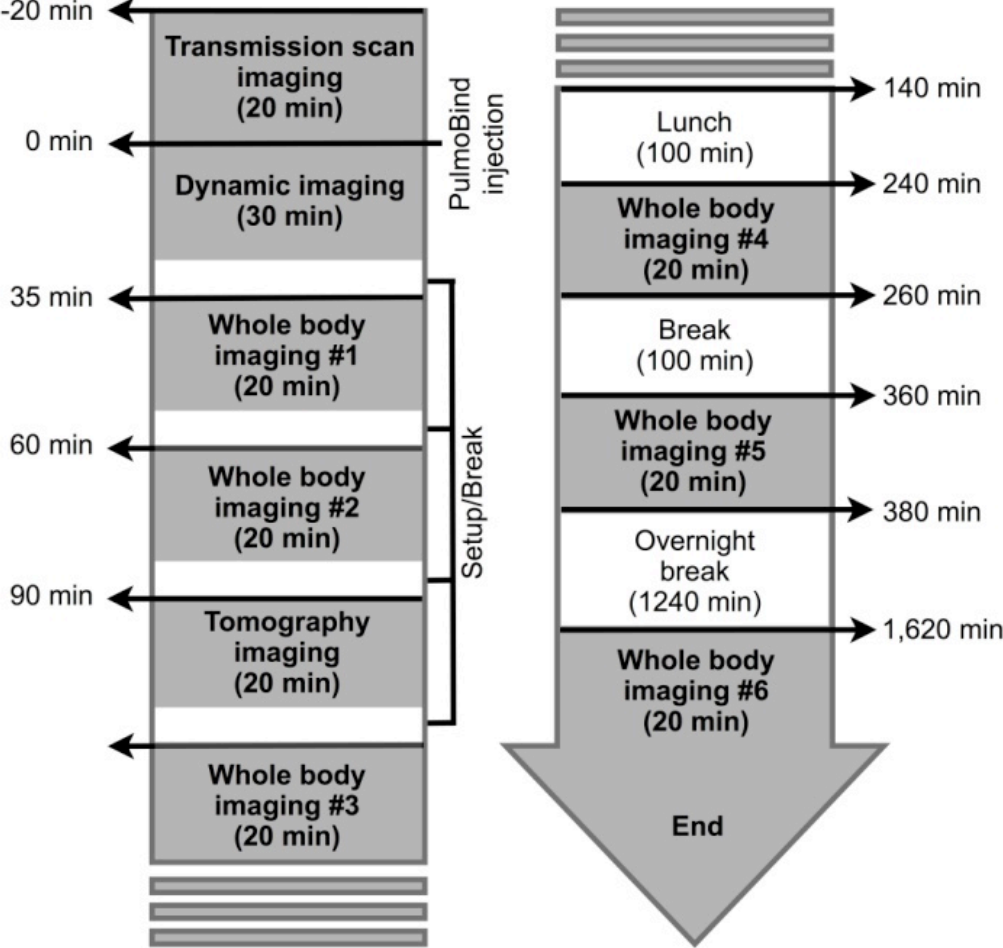


Figure 2 Plasma kinetics of 99mTc-PulmoBind in humans

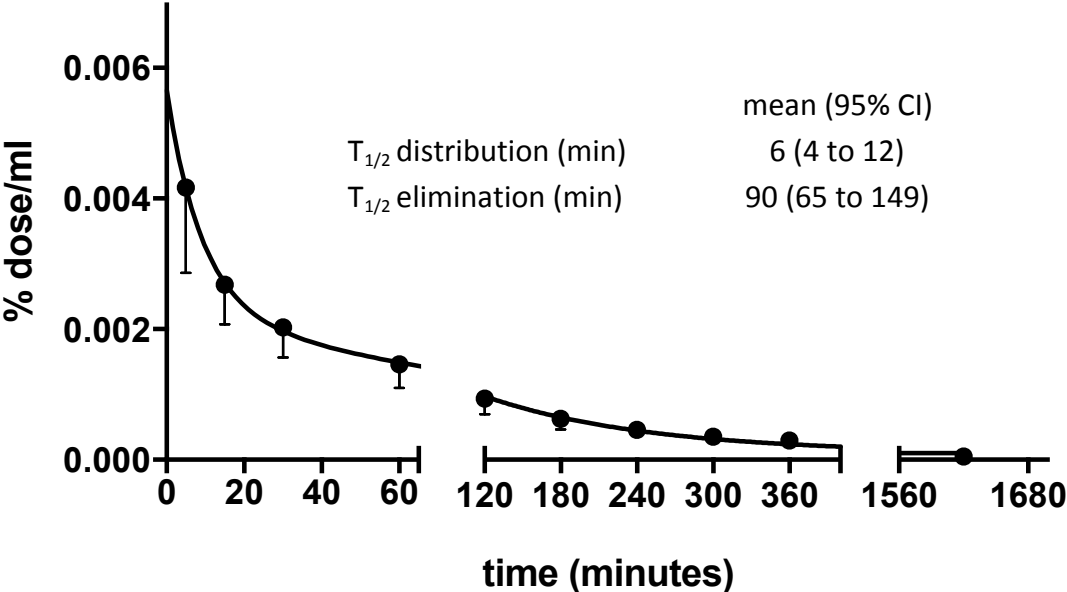
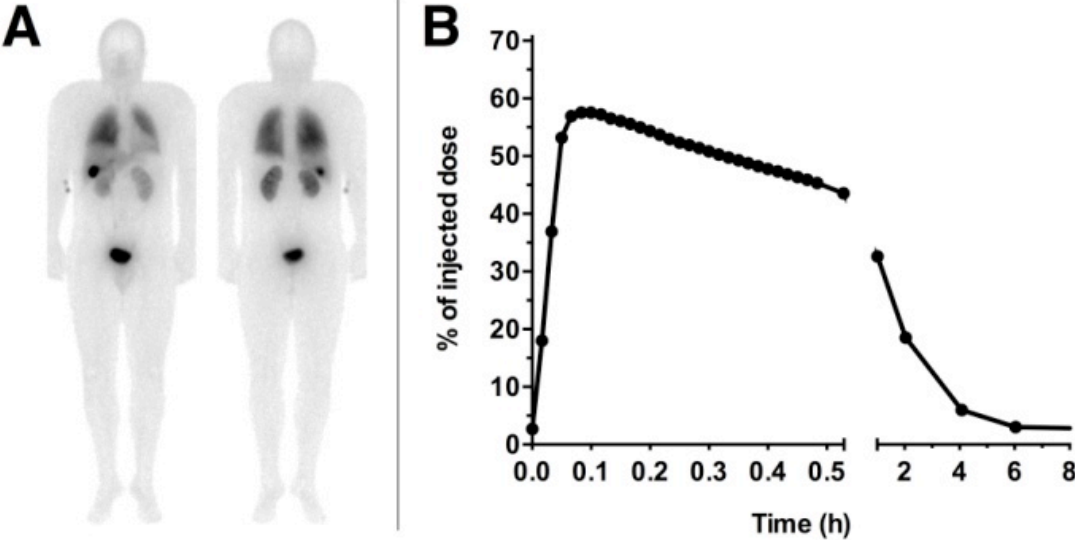


Figure 3 Whole body planar SPECT imaging in a human (subject 006) 60 min after injection of <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind and activity-time curve for lung activity of the tracer



**Figure 4 (A) Organs biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind at various time points after injection for all study groups combined (n=19)**

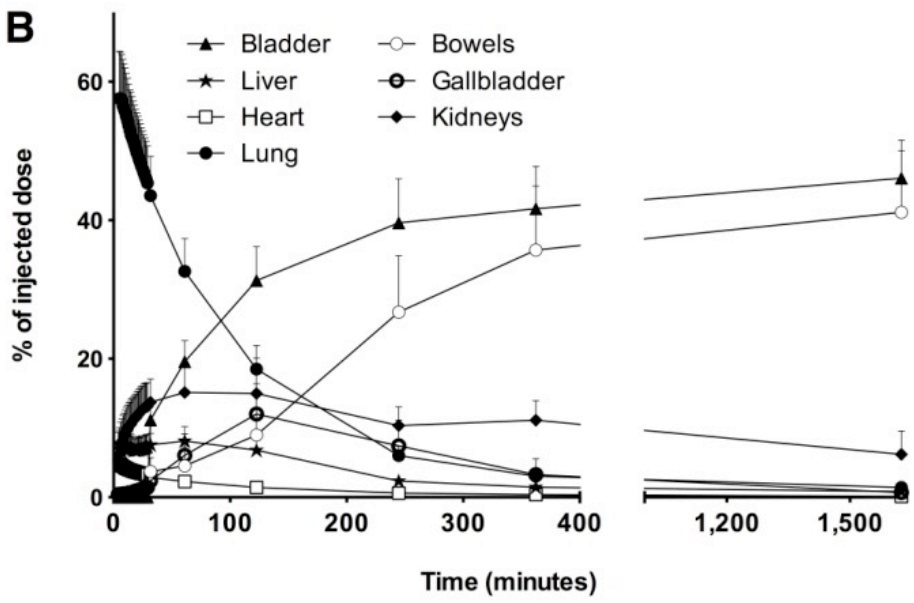
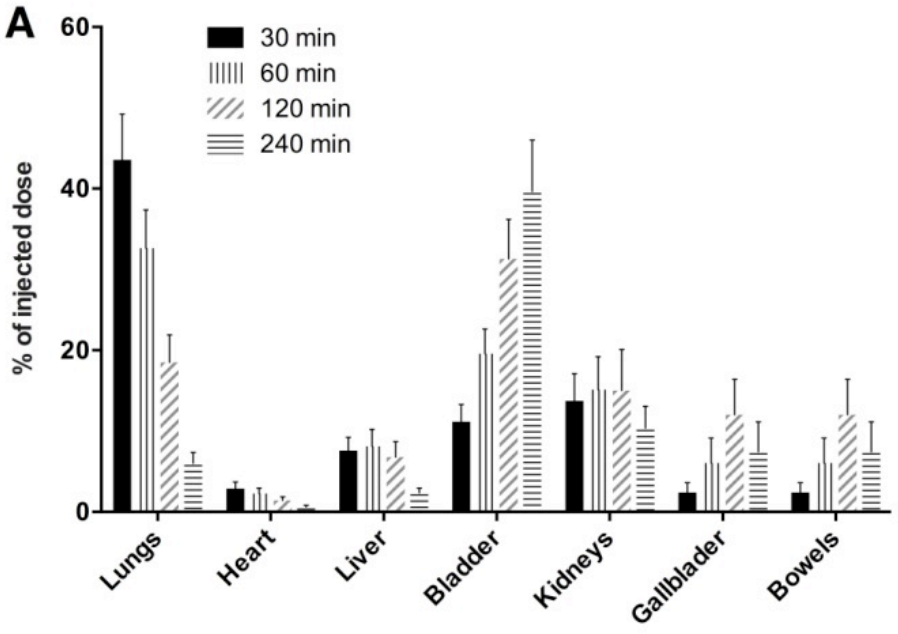




Figure 5 Tomographic SPECT imaging of the lungs 90 min after <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind injection in human in transversal, sagittal and frontal views.



**Figure 6 Effect of PulmoBind on systemic blood pressure of all study groups (n = 20).**

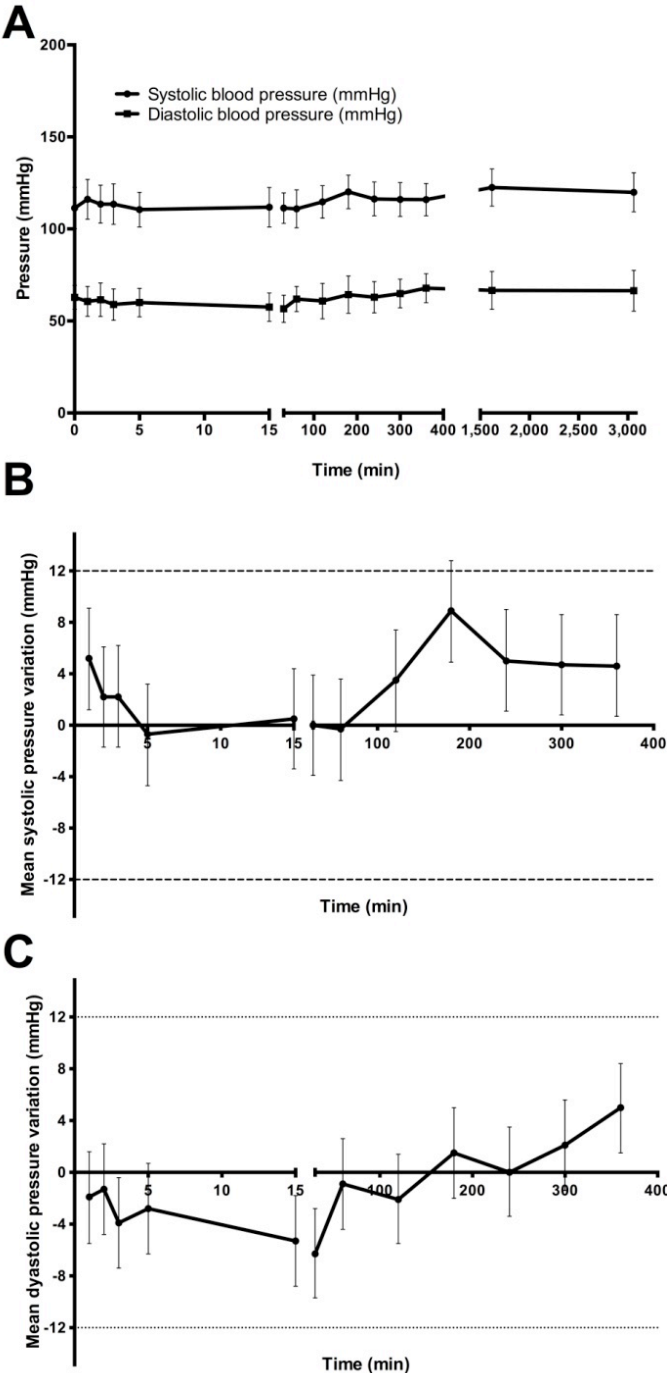
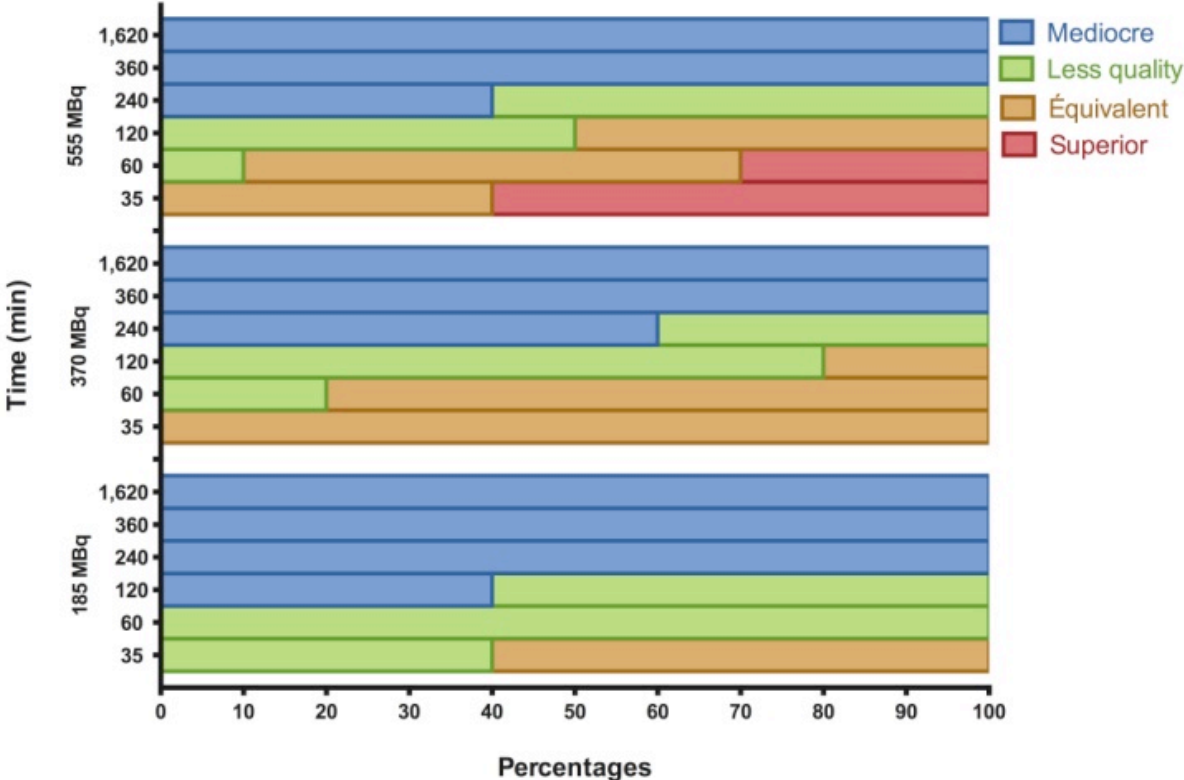


Figure 7 Imaging quality at dosages of 5 mCi (185 MBq, n = 5), 10 mCi (370 MBq, n = 5) and 15 mCi (555 MBq, n = 9) 99mTc-PulmoBind at various time points after injection



## 8.7 Supplemental data

### INCLUSION-EXCLUSION CRITERIA

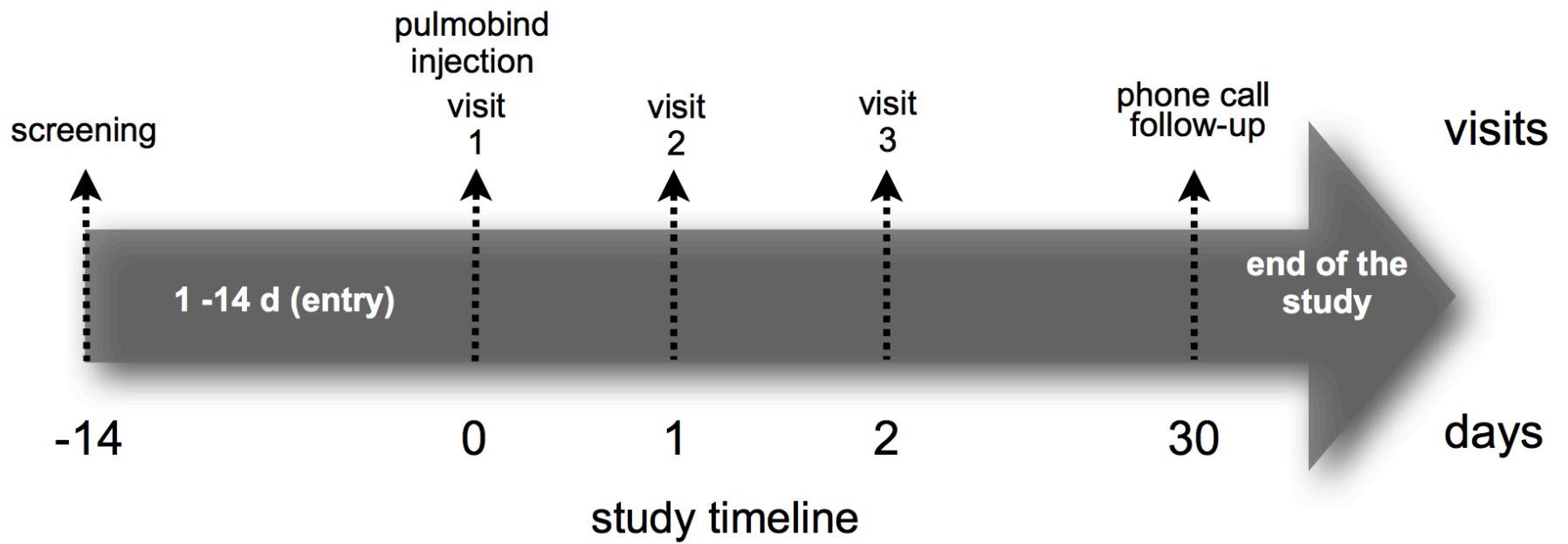
#### **Inclusion criteria**

1. Male and female subjects greater than 18 years of age. Female subjects must be post-menopausal (defined as two year after last menstrual cycle).
2. Baseline measurements must be in limit of normal for:
  - a. Blood pressure: systolic 100 mmHg to 140 mmHg, and diastolic 50 mmHg to 90 mmHg;
  - b. Heart rate: 60 to 100 beats per minute;
  - c. Oral temperature: less than 37.6°C;
  - d. Respiratory rate: 12 to 20 breaths per min;
  - e. Lung function tests;
  - f. Echocardiogram including estimation of pulmonary artery systolic pressure ;
  - g. Chest X-Ray;
  - h. Electrocardiogram.

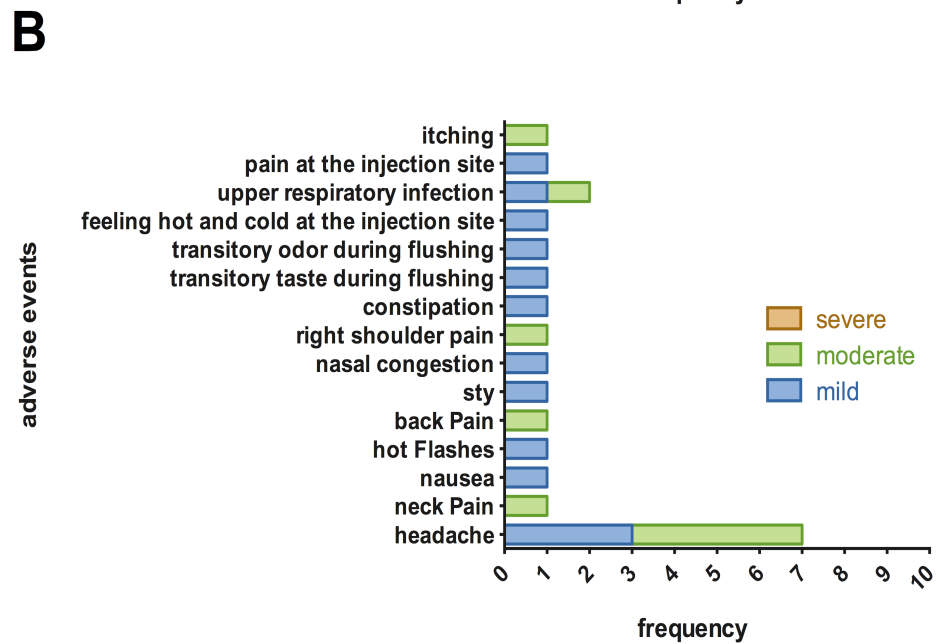
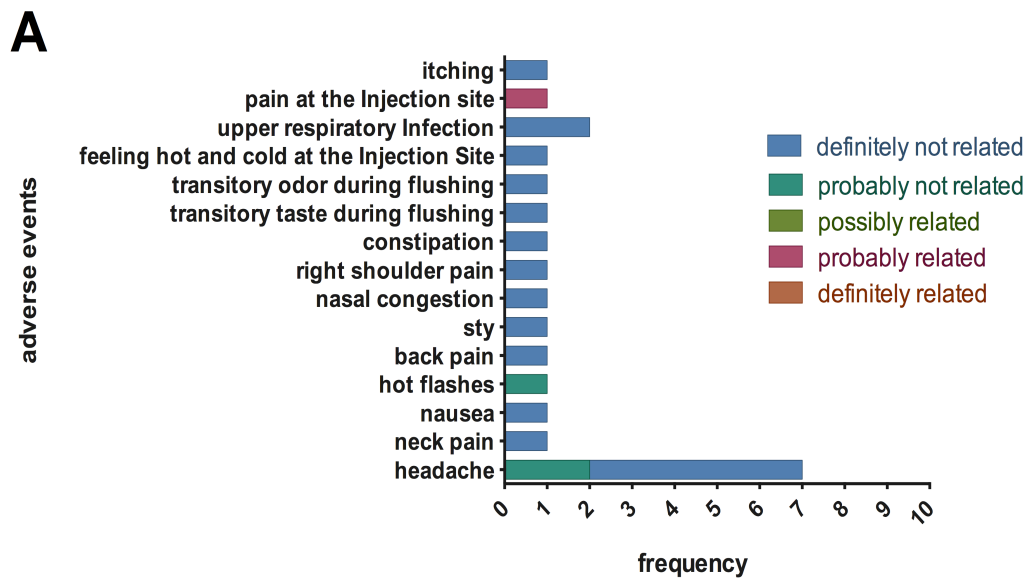
## **Exclusion criteria**

1. Any known chronic or acute medical condition with or without the need for chronic pharmacologic therapy or any condition that may interfere with normal biodistribution of DFH-12. This includes but is not restricted to: lung parenchymal or lung vascular diseases such as chronic obstructive pulmonary disease, bronchitis, lung cancer, pleural effusion, emphysema, asthma, pulmonary fibrosis, occupational lung disease, pulmonary hypertension (primary or secondary), systemic hypertension, diabetes, cancer, kidney disease, liver disease, heart failure or previous myocardial infarction, coronary artery disease, peripheral vascular disease or inflammatory disease.
2. Subjects requiring chronic administration of any substance for a medical condition.
3. Active smoking or history of smoking for more than one year in the past 10 years.
4. Known self-reported alcoholism (active or abstinent). Subjects with possible alcohol dependence will complete the Michigan Alcohol Screening Test (MAST) and will be excluded if score is  $\geq 6$ .
5. Unable to tolerate study procedures (e.g. venipuncture, movement restrictions during imaging).
6. Previous nuclear study since one week (to avoid cross-contamination).

**Supplemental Figure 1.** Study Timeline.



Supplemental Figure 2. Study Adverse Events.



Panel A: Frequency of adverse events and relationship to study drug.

Panel B: Frequency of adverse events and intensity.

## **8.8 Study protocol**

Le protocole de la phase I clinique du PB vous est présenté en annexe 1.



# Chapitre 9

## Article #2

Levac X, Harel F, Finnerty V, Nguyen QT, Letourneau M, Marcil S, Fournier A, Dupuis J: *Evaluation of pulmonary perfusion by SPECT imaging using an endothelial cell tracer in supine humans and dogs*. EJNMMI Res 2016, 6(1):43.

## Article 2 Evaluation of Pulmonary Perfusion Using an endothelial Cell Tracer in supine Humans and Dogs

Xavier Levac, MSc,<sup>\*,†</sup> François Harel, MD PhD,<sup>\*,‡</sup> Vincent Finnerty, MSc,<sup>\*</sup> Quang T. Nguyen, PhD,<sup>\*</sup> Myriam Letourneau, MSc,<sup>¶</sup> Sophie Marcil, NMT,<sup>\*</sup> Alain Fournier, PhD,<sup>¶</sup> and Jocelyn Dupuis, MD PhD<sup>\*,†</sup>

*Laval and Montreal, Canada*

**Word count:** 4765

**Short Title:** Lung perfusion with an endothelial tracer

**Funding support:** Quebec Consortium for Drug Discovery (CQDM), Montreal, Canada

**Disclosures:** Dr Jocelyn Dupuis is a shareholder and administrator of PulmoScience Inc., a company that holds commercial rights to PulmoBind. The other authors report no conflict.

---

*<sup>\*</sup>Research Center, Montreal Heart Institute; Departments of <sup>†</sup>Medicine <sup>‡</sup>Nuclear Medicine and, Université de Montréal, Montréal (Québec); and <sup>¶</sup>INRS-Institut Armand Frappier, Laval (Québec), Canada*

## 9.1 Abstract

**Objectives** To evaluate human pulmonary perfusion using a novel endothelial cell tracer.

**Background** Pulmonary perfusion is not homogeneously distributed and its variations could be of diagnostic value. PulmoBind is a ligand of the adrenomedullin receptor expressed in endothelial cells of lung capillaries. The spatial distribution of human lung perfusion has never been evaluated using a molecular tracer.

**Methods** Normal humans (n = 19) enrolled into the PulmoBind phase I trial were studied (Clinicaltrials.gov NCT01539889). They were injected with  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind for SPECT imaging. Results were compared with  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind in quadruped mammals (dogs, n = 5). Imaging was performed in the supine position and activity was determined as a function of cumulative voxels along different planes.

**Results** PulmoBind uptake in humans was  $58\% \pm 1\%$  (mean  $\pm$  SEM) of the injected dose. Dorsal activity was  $18.1\% \pm 2.1\%$  greater than ventral, and caudal activity was  $25.7\% \pm 1.6\%$  greater than cranial. Lateral activity was only mildly higher than medial by  $7.0\% \pm 1.0\%$ . In supine dogs, similar but higher PulmoBind gradients were present: dorsal  $28.6\% \pm 2.5\%$ , caudal  $34.1\% \pm 5.0\%$  and lateral  $18.1\% \pm 2.0\%$ .

**Conclusions** The perfused pulmonary circulation of supine humans, assessed by an adrenomedullin receptor ligand, is not homogeneously distributed with more prominent distribution in dorsal and caudal regions. It is qualitatively similar to a supine quadruped mammal confirming the presence of a microcirculatory gravitational perfusion gradient detectable with this tracer. Future studies are needed to determine if this novel endothelial cell tracer could be used to detect physiologic and pathologic variations of lung perfusion.

**KeyWords:** Pulmonary vascular endothelium▪ molecular imaging▪ nuclear medicine▪ adrenomedullin

### Condensed abstract

This study evaluated human pulmonary perfusion by SPECT imaging using  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind, an endothelial cell tracer that binds to the adrenomedullin receptor. In 19 healthy subjects, PulmoBind lung distribution was not homogeneous with a supine postural gradient more prominent in the dorsal and caudal regions. A similar perfusion gradient was found in supine dogs confirming a gravitational influence on lung microcirculatory perfusion. This novel agent could be of value to study lung perfusion and its variations in lung vascular disease.

## Abbreviations

$^{99m}\text{Tc}$  =  $^{99m}$ technetium

AUC = area under the curve

CT = computed tomography

MAA = macroaggregates of albumin

MRI = magnetic resonance imaging

ROI = region of interest

SPECT = single photon emission computed tomography

VAQ = volume of activity quartiles

## 9.2 Introduction

It is well established that pulmonary perfusion is not homogeneously distributed [183, 184]. Both gravity-dependent and gravity-independent factors contribute to the spatial distribution of pulmonary perfusion, their relative importance being the subject of passionate scientific debates [185-189]. There is however consensus that this heterogeneity confers great capacitance to the pulmonary vasculature and the possibility to increase (recruit) tissue perfusion for gas and metabolic exchanges in response to increasing cardiac output. Study of the spatial distribution of pulmonary perfusion may be of great value in evaluating the pulmonary vascular reserve and its variations in health and disease.

Various imaging modalities have been utilized to study the spatial distribution of pulmonary perfusion in humans including computerized tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography and single photon emission computed tomography (SPECT). All of these methods have relied on the use of physical and structural agents distributed within the pulmonary circulation and whose external signals are reflections of flow. There is therefore currently no clinically validated imaging agent that relies on biologic properties of the endothelium and can quantitatively assess the spatial distribution of perfusion to the metabolically active pulmonary circulation and its variations in health and disease.

We developed a new tracer that can provide molecular SPECT imaging of the perfused lung capillaries by binding to pulmonary vascular endothelium. This tracer is an adrenomedullin receptor ligand called PulmoBind. PulmoBind was specifically developed for molecular SPECT imaging of the pulmonary circulation by labelling with  $^{99m}\text{Tc}$  [61]. Adrenomedullin receptors are abundantly distributed in human alveolar capillaries mostly at the luminal surface of the vascular

endothelium [172-174] and are responsible for important lung clearance of this peptide [170]. A safety and dosimetric study of PulmoBind in human subjects was recently completed [190]. PulmoBind was found to be safe with rapid and important lung uptake. The majority of injected PulmoBind (~58%) is retained by the human lung.

The primary aim of this study was to analyse the spatial distribution of the perfused lung capillaries in healthy human subjects by molecular SPECT imaging using PulmoBind. A secondary aim was to compare this distribution to that obtained with SPECT PulmoBind imaging in a quadruped mammal (dogs).

### 9.3 Methods

We studied subjects enrolled into the PulmoBind phase I safety study (study number: PB-01) conducted at the Montreal Heart Institute and registered at Clinicaltrials.gov (NCT01539889) [190]. Twenty healthy non-smoking volunteers (18 men, 2 women) with a mean age of  $34 \pm 15$  years (mean  $\pm$  SD) and weight of  $75 \pm 14$  kg (mean  $\pm$  SD) were included into study PB-01. In one male subject, SPECT imaging was not analysable due to improper injection of the tracer so that 19 subjects were included in the present study. They had normal biochemistry and haematology, echocardiogram, chest x-rays and respiratory function tests. The study was approved by the institutional ethic and scientific review boards and was done in accordance with the Declaration of Helsinki and International Conference on Harmonization/Good Clinical Practice guidelines. Written informed consent was obtained from each participant.

Details concerning the synthesis and radiolabelling of PulmoBind were previously described thoroughly [61]. The subjects received between 5 mCi to 15 mCi of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind with a mean radiochemical purity of  $95 \pm 4\%$  (mean  $\pm$  SD). Prior to administration, total injection syringe activity was determined. The participants were lying in supine position 30 minutes before administration.  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind was injected intravenously over 3 minutes with an automatic injector. Ninety minutes later, SPECT imaging was performed with an E-cam Dual Head Gamma Camera equipped with a low-energy and high-resolution collimator. Acquisition parameters were: 128 x 128 pixels matrix, 64 frames over  $360^\circ$ , zoom 1.0, pixels size of 2.67 mm, 35s per acquisition view and total imaging time of 20 minutes. Following the imaging protocol, residual activity of the syringe was measured to determine the injected activity.



## Image analysis

Tomographic datasets were reconstructed using 3D OSEM (ordered subset expectation maximization) iterative reconstruction algorithm with 3D Gaussian filtering for noise reduction. Semi-automatic 3D ROIs were drawn using ITK-snap 2.2.0 and analyzed using in-house software designed with MATLAB 2013a ((Mathworks, Natick, Massachusetts, USA).

To quantify the spatial distribution of pulmonary perfusion, voxels within the ROI for each slice following the dorsoventral, caudocranial and mediolateral axes were extracted to measure the number of voxels and total activity profile along each of those planes. The right and left lungs were included into one ROI for each axis. For the mediolateral axis, the right lung was flipped and translated to align geometrically with the left lung and included into one ROI.

Spatial distribution of uptake was determined by first computing the relative concentration for each slice as a function of cumulative voxels in the 3 different axes.

$$\text{Relative Concentration} = \frac{\text{Mean activity per voxel in slice}}{\text{Mean activity of all slices in ROI}} \times 100$$

The difference between each slice relative concentration and the overall mean ROI activity (100%) was then plotted as a function of cumulative voxels along each respective axis and reported as the relative concentration difference. Consequently, a slice with mean activity per voxel equal to mean activity of the ROI would have a difference of 0%. A positive or negative difference respectively represents the mean percent higher or lower activity for each slice compared to the whole ROI mean slice activity.

To determine the activity gradient along each axis, two distinct same-size compartments each containing 50% of the voxels were created. The mean relative concentrations of the two compartments were subtracted to determine the gradient along each axis. Thus, equal activities in both compartments would give a gradient of 0. A positive or negative difference represents the respective percentage of decreasing or increasing gradient along the studied axis.

Additionally, to have a complementary graphical representation of the activity distribution along each axis, a graph of cumulative activity as a function of cumulative voxels was created. Quartiles of activity and their corresponding lung volumes at 25% (VAQ25), 50% (VAQ50) and 75% (VAQ75) were determined as well as the AUC of these graphics. Therefore, in the event where 25%, 50% and 75% of total activity is reached before or after 25%, 50% and 75% of total voxels or in the event where AUC is different from 5000 (AUC of a directly proportional situation between activity and volume), this would represent a non-uniform distribution with a perfusion gradient.

Finally, a semi-quantitative analysis was made to determine the distribution of activity intensity independently of the spatial distribution. To do so, a frequency histogram of activity intensity per voxel throughout the ROI was obtained. The voxels were grouped depending on their intensity in 15 consecutive bins of increasing 6.67% activity steps from 0% (no activity) to 100% (maximum pixel activity in the ROI). A graph representing the frequency of voxels (equivalent to the percentage of lung volume) was then plotted as a function of the 15 intensity bins.

## **Spatial distribution of $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind in a quadruped mammal**

Five adult mongrel dogs weighing 9-13kg were used in this study. Study protocol was approved by the animal research and ethics review board and conducted in accordance with the regulations and ethical guidelines from the Canadian Council for the Care of Laboratory Animals. After administration of 30 mg/kg pentobarbital sodium the animals were intubated with an endotracheal tube. Anaesthesia was maintained with 1-3% isoflurane. The animals were installed in supine position and an IV catheter installed in a posterior paw vein for PulmoBind administration. The tracer was injected and a pulmonary SPECT and image analysis were performed as described above.

### **Statistics analysis**

Values are means and standard error of the mean (SEM) unless indicated otherwise. Differences from the PulmoBind-human group were evaluated by two-tailed t-tests. The pulmonary activity-time curve of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind was integrated from appearance to peak. Peak activity and the integrated activity were corrected for body surface area. Both corrected and uncorrected parameters were correlated with age, height, weight, plasma creatinine and respiratory function test parameters using a Pearson correlation matrix. Analysis was performed using SAS 9.3 and GraphPad Prism 6 softwares.

## 9.4 Results

Labelled PulmoBind was prominently retained by the lungs with a peak uptake of  $58\% \pm 1\%$  of the injected dose occurring  $5.5 \pm 0.2$  minutes following injection with an area under the activity-time curve (AUC) of  $9089 \pm 344$ . Kinetic analysis (Fig. 1) reveals rapid lung uptake with very slow decay of activity that remains at  $44\% \pm 1\%$  after 30 min and  $33\% \pm 1\%$  after 60 minutes. Whole body planar imaging at 60 minutes demonstrates persistent lung activity with elimination of the tracer by the kidneys and the liver as evidenced by urinary bladder and gallbladder activities. Complete safety and dosimetric analysis of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind were previously reported [190].

Peak  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind uptake by the lungs and the area under the activity-time curves were inversely correlated with age and positively correlated with respiratory function parameters (Table 1). In addition the integrated activity, but not peak uptake, correlated with body weight and height and with plasma creatinine. When parameters were indexed for body surface area, only age remained weakly inversely correlated with both indices, all other correlations becoming non-significant. This unique correlation was lost when the only 2 female subjects, which were also the oldest subjects, were removed from the analysis.

### Spatial distribution of PulmoBind as a function of cumulative voxels in the different planes

The PulmoBind relative concentration difference and cumulative activity in the different planes are shown in Figure 2 and Table 2. Overall, there was greater activity in the dorsal and caudal regions of the lungs compared to the ventral and cranial regions. There was almost even distribution in the mediolateral plane, the activity being slightly higher in the lateral regions. This creates a gradient of decreasing activity of  $18.1 \pm 2.1\%$  between the dorsal and ventral

compartments, and of  $25.7 \pm 1.6$  % between the caudal and cranial compartments. Between the medial and lateral compartments there was a mild positive gradient of  $7.0 \pm 1.0$  %. Interestingly, the use of PulmoBind in supine dogs resulted in perfusion gradients similar to those observed in supine humans. The magnitude of the gradient was however greater in the caudocranial axis, followed by the dorsoventral and sagittal axis (Fig. 3 and Table 2).

### **Cumulative PulmoBind concentrations as a function of cumulative voxels in the different planes.**

Cumulative quartiles representing 25 %, 50 % and 75 % of total lung activity and their respective corresponding cumulative % voxels and AUCs are presented in Table 3 and Figure 4 for the three axes. For PulmoBind in humans, there is asymmetrical distribution of activity as each activity quartile is reached before its respective cumulative voxels quartile in the dorsoventral and the caudocranial axis. There was again more even distribution in the mediolateral plane, as quartiles of activity were only slightly higher than corresponding cumulative voxels. Results for PulmoBind in dogs also showed evident gradients of a greater magnitude than those in humans.

### **Frequency histograms of lung activity for PulmoBind**

The percentage of lung volume for each of 15 increasing intensity bins for PumoBind in Humans and dogs are shown in Figure 5. The frequency distribution of PumoBind intensity in humans and dogs was similar, displaying a standard bell curve with unimodal distribution slightly skewed to the left lower intensity bins.

## 9.5 Discussion

The spatial distribution of pulmonary blood flow is heterogeneous owing to both gravity-dependent and independent factors. The original zone model proposed by West et al. and based on the interplay between the alveolar and capillary pressures along the vertical axis of the lung has been challenged by numerous studies showing gravity-independent heterogeneity of flow. A fractal model incorporating isogravitational heterogeneity was therefore proposed by Glenny [191-193] and suggested that as spatial resolution of the instruments of measure is improved, isogravitational perfusion heterogeneity is revealed [185]. In human subjects, physical tracers such as radiolabelled MAA with SPECT imaging or intravascular contrast agents with computed tomography or magnetic resonance imaging have been used to study the distribution of blood flow. The aim of the current study was to use, for the first time, a metabolic tracer of pulmonary perfusion to determine the spatial distribution of lung microcirculatory perfusion. To explore the effects of gravity and species-specific lung geometry, we compared to results obtained in a quadruped mammal (dogs) also in the supine position.

We found that the spatial distribution of PulmoBind was heterogeneous with a predominant uptake in the more gravity-dependent dorsal and caudal regions of supine humans. There was consequently pronounced dorsoventral and caudocranial gradients of perfusion. There was also a milder mediolateral gradient. In supine dogs, the distribution of PulmoBind showed similar gradients, but of greater magnitude. Our findings therefore confirm the presence of a postural perfusion gradient, in the direction of gravity, present in both humans and in quadrupeds lying supine.

PulmoBind is derived from human adrenomedullin and specifically binds to the adrenomedullin receptor. This receptor, a heterodimer composed of the calcitonin-like receptor and the receptor activity modifying protein 2 (CLR-RAMP2), is densely distributed in the alveolar capillaries of human lungs. Accordingly, adrenomedullin is rapidly extracted upon its first pass through the pulmonary circulation. PulmoBind uptake by the lung is therefore modified not only by blockage of large pulmonary arteries, but can also detect blockage of small pulmonary arterioles in models of pulmonary arterial hypertension such as the monocrotaline model [60] and the hypoxia-sugen model [194]. As such, PulmoBind is a metabolic tracer and its distribution is related to lung microcirculatory perfusion and endothelium integrity. This differs from MAA which distribution relies exclusively on their physical properties. Approximately 500,000 MAA particles varying in size from 10  $\mu\text{m}$  to 90  $\mu\text{m}$  are intravenously injected and get trapped into the microcirculation following the distribution of pulmonary blood flow, which will temporarily occlude 1 in 1000 pulmonary arterioles. The number of particles injected and their size will vary between tests. Radiolabelled MAA have been used to semi-quantitatively assess the spatial pulmonary perfusion in normal lungs [183, 195-198]. Similar to these previous studies, but using a different methodological approach, we observe gravity-dependent and -independent distribution of MAA in humans. Previous investigators have hypothesized that isogravitational heterogeneity resulted from varying regional vascular conductance at branching points [184, 199]. Indeed, studies performed in microgravity environment revealed that some lung perfusion heterogeneity persisted [200]. A novel fractal model incorporating isogravitational heterogeneity was proposed by Glenny [191-193] and suggests that as spatial resolution of the instruments of measure is improved, isogravitational perfusion heterogeneity is revealed [185]. Interestingly, PulmoBind activity gradients in dogs studied in the supine position were quite similar to those in humans but of higher magnitude,

possibly due to anatomical differences in lung geometry and posture between species. The frequency distribution of PulmoBind lung activity (Fig. 5) showed a standard bell curve profile with unimodal distribution in both humans and in dogs. This suggests normal distribution of the adrenomedullin receptor in the pulmonary circulation of both species

In a recent phase I study of PulmoBind, qualitative analysis of lung scans by experienced nuclear specialist revealed that PulmoBind imaging quality was superior to that historically obtained with MAA. Mean PulmoBind uptake by the human lungs showed little variability. After indexing for body surface area, uptake did not correlate with respiratory function parameters. The only significant correlation, although mild, was an inverse relationship with age. We also cannot exclude a relationship with gender as the only two female participants were the two older subjects driving this correlation. Future studies in a larger number of subjects will be necessary to explore this issue.

We used a novel approach to the evaluation of spatial distribution of SPECT imaging activity by computing relative concentrations and cumulative activity as a function of cumulative voxels in different axes. By using cumulative voxels we reduced inter-individual variability and we show that this correlated well with distance along the lungs. Inherent limitations to the use of SPECT imaging are its lower resolution compared to MRI or CT and the occurrence of partial volume and edge effects.

Our findings could have clinical applications as the spatial distribution of lung perfusion is modified in physiologic and pathologic conditions. Using the multiple indicator-dilution technique in exercising dogs, we demonstrated that the metabolically active pulmonary vascular surface-area increased almost linearly with tripling of blood flow [170]. There is therefore a pulmonary vascular



“reserve” that can accommodate the increase in cardiac output and expand the surface for gas exchange and metabolic functions. Lung vascular recruitment in response to increasing blood flow will accordingly modify the spatial distribution of pulmonary distribution with a reduction in the gravitational circulation component. Furthermore, evaluation of the distribution of pulmonary perfusion could be of value in the evaluation of lung disorders, such as pulmonary arterial hypertension. A recent study evaluating the distribution of MAA demonstrated that its distribution was modified in subjects with pulmonary arterial hypertension [201]. A phase II study of PulmoBind in subjects with pulmonary arterial hypertension will be evaluating this concept (clinicaltrials.gov NCT02216279). Study of the spatial distribution of the metabolically active pulmonary circulation at rest and with increasing pulmonary blood flow, such as exercise, could provide a unique insight into the capacity of the lung to recruit vascular surface area. Conversely, variations in the spatial distribution of pulmonary perfusion in conditions associated with a loss of recruitable pulmonary perfusion, such as pulmonary arterial hypertension, could provide a unique method to diagnose and evaluate lung vascular dysfunction.

## **9.6 Conclusion**

We used an adrenomedullin receptor ligand to evaluate the spatial distribution of the perfused lung microcirculation in the supine human. The perfusion was heterogeneous with a predominant distribution in the more gravity-dependant dorsal and caudal lung regions. A similar gradient was confirmed in supine dogs. Future studies are needed to determine if this novel endothelial cell tracer could be used to detect physiologic and pathologic variations of lung perfusion.

## **Perspectives**

### **Clinical competencies:**

This study provides knowledge about the normal distribution of pulmonary perfusion in humans. The distribution is not homogeneous with gravity-dependent and gravity-independent factors resulting in greater dorsal and caudal distribution of flow in the supine position.

### **Translational outlook:**

Evaluation of lung perfusion and its distribution in physiologic and pathologic lung vascular conditions could provide useful clinical information for diagnosis and therapy.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Emma Dedelis for her technical assistance.

## **Funding**

Quebec Consortium for Drug Discovery (CQDM), Montreal, Canada

## Figure Legend

### **Figure 1 Dynamic SPECT imaging of pulmonary perfusion with $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind in human**

A) Dynamic SPECT imaging after forearm vein injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind in a human subject. B) Lung biodistribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind at various times in human subjects (n = 19). C) Whole body planar scintigraphy in a human 30 min after injection (posterior view).

### **Figure 2 *Central illustration.* Pulmonary Spatial Distribution of $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind in Healthy Humans (n=19)**

A) Comparison of the relative concentration difference as a function of cumulative voxels in dorsoventral, caudocranial and mediolateral axes. B) Cumulative relative activity as a function of cumulative voxels in the three planes. C) Representative SPECT imaging of spatial distribution in transverse, sagittal and coronal planes in subject 006. The arrows point in the direction of perfusion gradients.

### **Figure 3 Comparative distribution of lung perfusion in humans and dogs**

Comparison of the relative concentration difference as a function of cumulative voxels between PulmoBind-Humans (n = 19) and PulmoBind-dogs (n = 5) in dorsoventral (A), caudocranial (B) and mediolateral axes (C).

**Figure 4 Cumulative perfusion activity as a function of lung volume in humans and dogs**

Cumulative relative activity as a function of cumulative voxels in dorsoventral (A), caudocranial (B) and mediolateral (C) axes for PulmoBind in humans (n = 19) and PulmoBind in dogs (n = 5).

**Figure 5 Frequency distribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -PulmoBind in human and canine lungs**

Percentage of lung volume as a function of increasing activity bins in the lungs as obtained for PulmoBind in Humans (n = 19) and PulmoBind in dogs (n = 5). Bins are numbered 1 to 15 at every 6.67% cut-off level of the maximal pixel radioactivity from 0% (no activity) to 100% (maximum).

**Table 1 Correlation of Peak <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind Uptake and of Integrated Pulmonary Activity-Time Curves with Physiological and Respiratory Function Parameters**

Correlation coefficients				
	Peak uptake	Integrated uptake	Indexed Peak uptake	Indexed Integretad uptake
Age	-0.76‡	-0.59*	-0.49*	-0.48*
Creatinine	0.38	0.49*	0.19	0.45
Weight	0.41	0.50*	-0.34	0.42
Height	0.44	0.50*	-0.16	0.45
FVC	0.53*	0.61†	0.002	0.35
FEV <sub>1</sub>	0.60†	0.69‡	0.01	0.39
FEV <sub>1</sub> /FVC	0.51*	0.55*	0.02	0.28
PEF	0.48*	0.59†	-0.24	0.18

FC, forced vital capacity; FEV<sub>1</sub> forced expiratory volume in 1 second; PEF, peak expiratory flow. Parameters in the two right columns were indexed to body surface area.

\*p < .05, † p< .01, ‡ p< .001

**Table 2 Comparison of Pulmonary Perfusion Gradients in Humans and Dogs**

	<b>Dorsoventral</b>	<b>Caudocranial</b>	<b>Mediolateral</b>
	(%)	(%)	(%)
<b>PulmoBind-Humans</b>	18.1 ± 2.1	25.7 ± 1.6	-7.0 ± 1.0
<b>PulmoBind-Dogs</b>	28.6 ± 2.5*	34.1 ± 5.0*	-18.1 ± 2.0†

\*p < .05, † p < .001 vs PulmoBind-Humans

**Table 3 Volume of Activity Quartiles and Areas under the Cumulative Activity Curves**

		<b>Dorsoventral</b>	<b>Caudocranial</b>	<b>Mediolateral</b>
<b>VAQ25 (%)</b>	PulmoBind-Humans	20.9 ± 0.4	23.3 ± 0.2	27.8 ± 0.2
	PulmoBind-Dogs	21.6 ± 0.5	22.1 ± 1.1	28.8 ± 0.5*
<b>VAQ50 (%)</b>	PulmoBind-Humans	45.2 ± 0.6	44.4 ± 0.3	51.6 ± 0.2
	PulmoBind-Dogs	43.5 ± 0.6	42.4 ± 1.1*	54.1 ± 0.5‡
<b>VAQ75 (%)</b>	PulmoBind-Humans	72.4 ± 0.4	67.9 ± 0.4	74.2 ± 0.2
	PulmoBind-Dogs	68.0 ± 0.4‡	66.6 ± 0.9	76.1 ± 0.2†
<b>AUC-5000 (%<sup>2</sup>)</b>	PulmoBind-Humans	302 ± 34	395 ± 25	-92.5 ± 15.8
	PulmoBind-Dogs	452 ± 39*	502 ± 80	-223 ± 21†

Cumulative voxels representing 25% (VAQ25), 50% (VAQ50) and 75% (VAQ75) of cumulative <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind activity for each axis. AUC-5000 represents the deviation from a line of identity indicative of a positive or negative gradient vs PulmoBind-Humans. \*p < . 05, † p < . 01, ‡ p < . 001 vs PulmoBind-Humans



**Figure 1 Dynamic SPECT imaging of pulmonary perfusion with <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind in human**

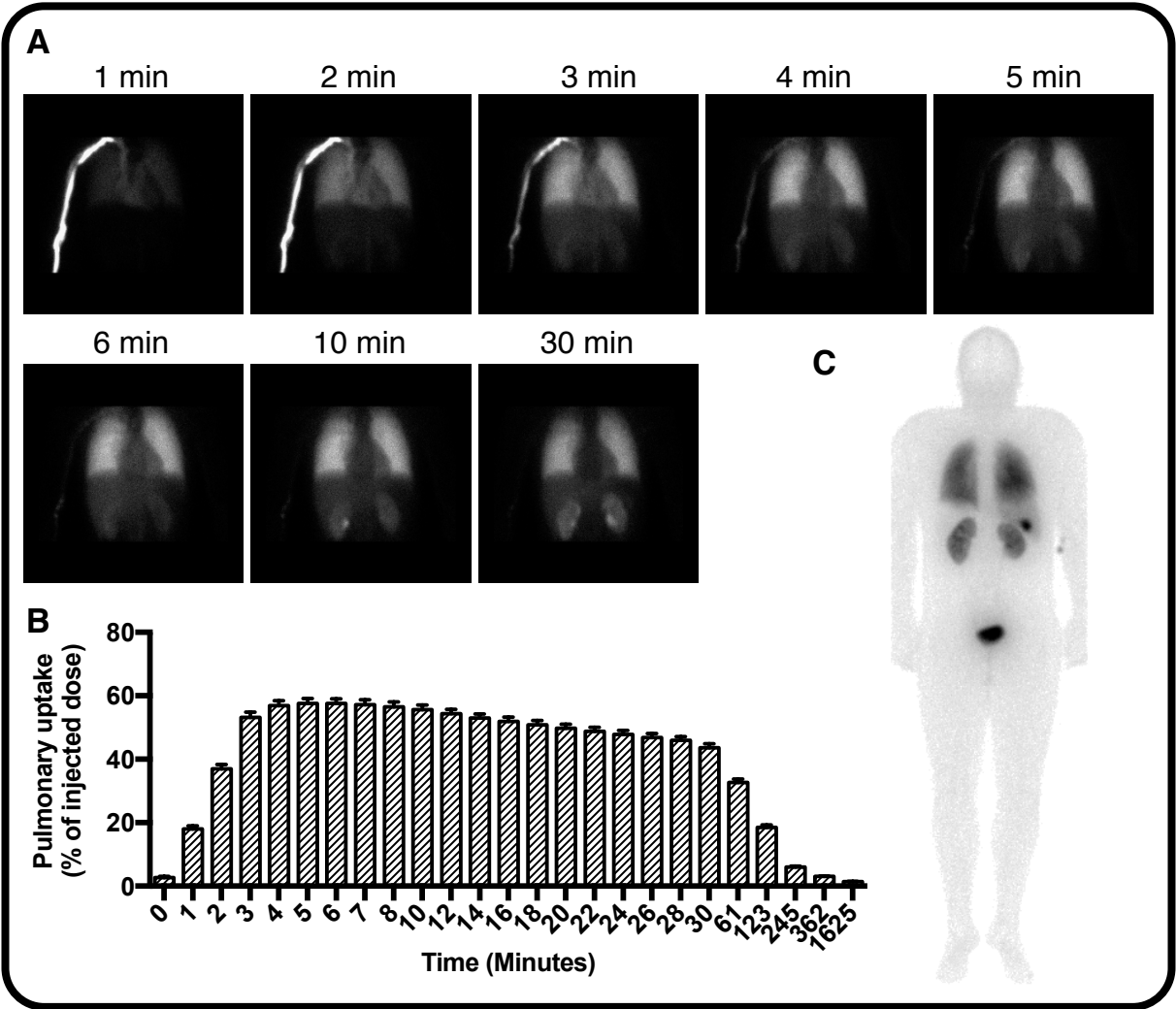


Figure 2 Central illustration. Pulmonary Spatial Distribution of <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind in Healthy Humans (n=19)

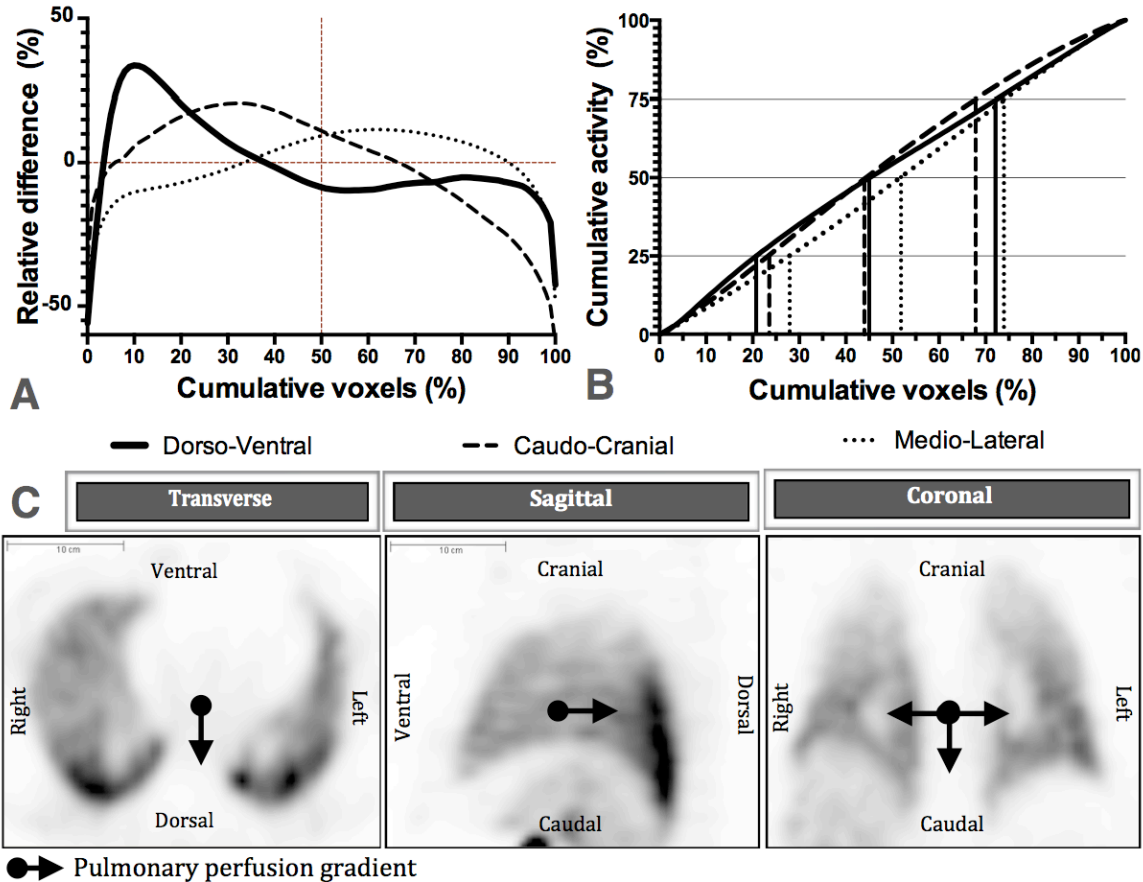


Figure 3 Comparative distribution of lung perfusion in humans and dogs

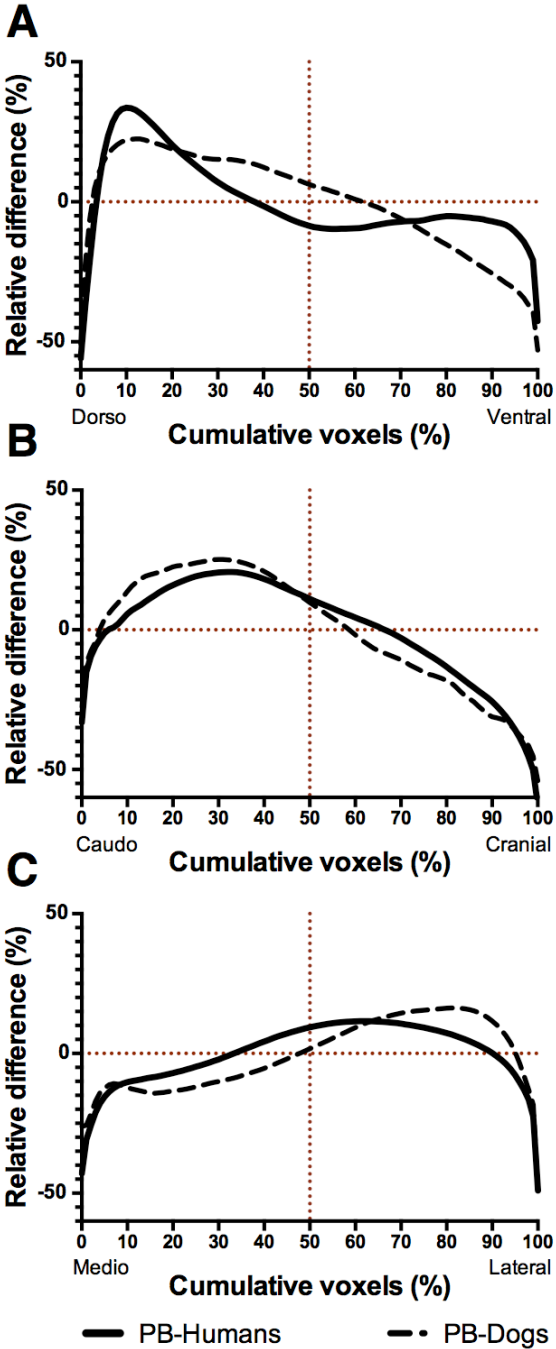


Figure 4 Cumulative perfusion activity as a function of lung volume in humans and dogs

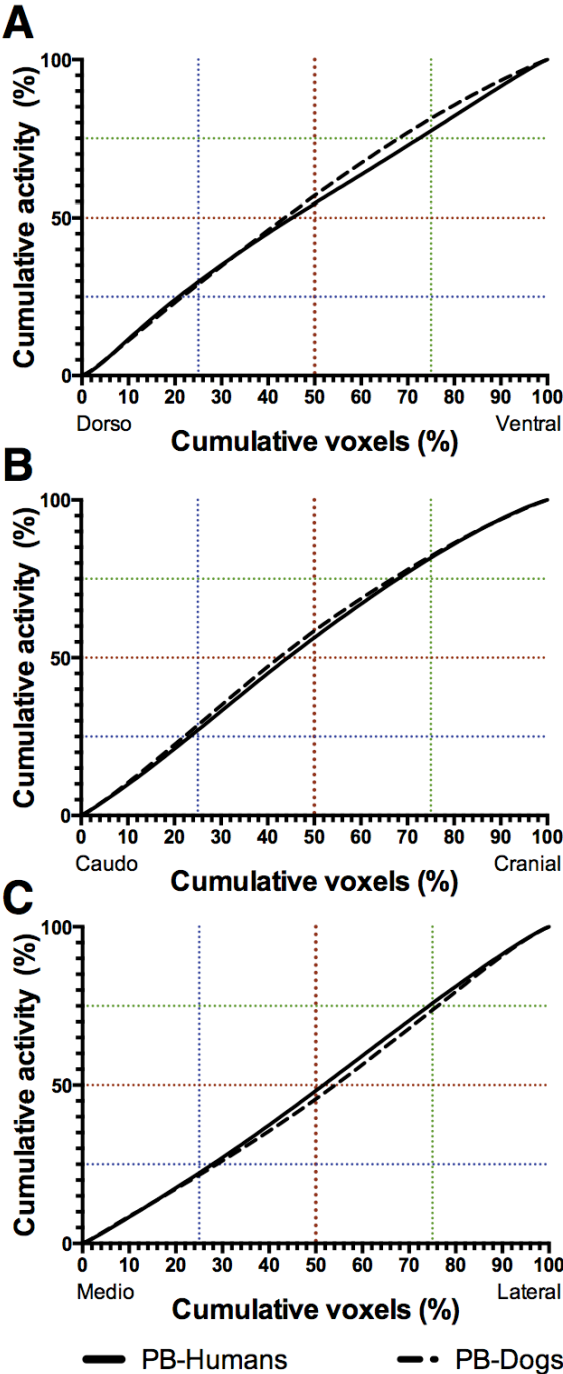
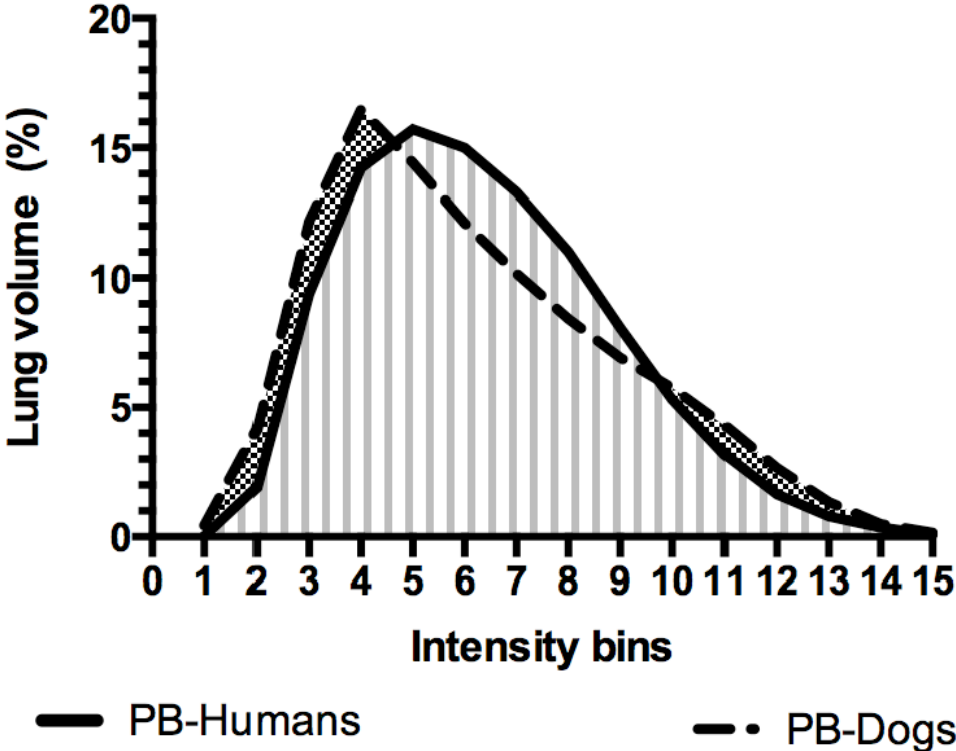


Figure 5 Frequency distribution of <sup>99m</sup>Tc-PulmoBind in human and canine lungs



---

---

# Chapitre 10

## Discussion

Le domaine de la médecine nucléaire est une discipline relativement nouvelle. C'est seulement en 1971 que celle-ci fut reconnue par l'American Medical Association comme étant une spécialité médicale. Depuis ces 40 dernières années, ce secteur en plein essor a toujours été soutenu par une recherche scientifique très active et prometteuse.

Dans le but de freiner et de mieux contrôler les dépenses en santé, le gouvernement du Québec ainsi que la santé publique devront dans un avenir rapproché investir davantage d'efforts en amont de la maladie. Pour ce faire, la médecine préventive et la recherche d'outils diagnostiques auront un rôle déterminant dans ce processus. Nous savons aujourd'hui que la prise en charge rapide d'une pathologie en améliore généralement le pronostic, en plus d'avoir une incidence bénéfique sur les taux d'hospitalisation et sur la quantité de médicaments prescrites. Il devient alors important de développer des outils performants qui peuvent favoriser un diagnostic précoce et une prise en charge rapide du patient. C'est pour cette raison que l'imagerie issue de la médecine nucléaire est une avenue non invasive prometteuse qui se démarque particulièrement en raison de son pouvoir d'imager les processus métaboliques.

Le succès de cette spécialité médicale repose en grande partie sur l'efficacité et la spécificité du radiopharmaceutique utilisé. Pour cette raison, dû à leur spécificité inhérente, les anticorps représentent les biomolécules les plus intéressantes pour l'élaboration d'un radiotraceur. Malheureusement, ceux-ci possèdent généralement une pharmacocinétique défavorable et entraînent souvent l'activation d'une réponse immunitaire. En revanche, les peptides figurent comme étant un second vecteur attrayant en médecine nucléaire. Ceux-ci sont caractérisés par une grande spécificité sans toutefois être fortement immunogène. De plus, ceux-ci ont en général une

bonne biodistribution, une bonne clairance et une bonne élimination qui permettent de diminuer l'exposition au rayonnement et de favoriser une meilleure radioprotection. Les peptides possèdent une certaine flexibilité structurale simplifiant leur modification lorsque cela est nécessaire. Parmi ces modifications envisageables, nous retrouvons entre autres l'introduction d'un agent chélateur dans le but de faciliter le marquage et d'améliorer la pureté radiochimique. Toutefois, la synthèse peptidique reste tout de même assez complexe. Cette complexité variera en fonction de la longueur du peptide et de sa composition. En dépit de sa longueur de 52 AA et de sa structure, notre laboratoire a été en mesure de développer le PB. Celui-ci est un nouveau radiotraceur peptidique pulmonaire dérivé de l'AM, un fruit de plusieurs années de recherche et de collaboration au sein de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Sa conception émane de l'analyse de la structure-activité de plusieurs analogues de l'AM. Au stade précoce de son développement, l'objectif premier était de déterminer un vecteur le plus spécifique et le plus sécuritaire possible afin d'observer la qualité de la perfusion pulmonaire. Les études précliniques sur le composé DFH-12 (PB) ont démontré un potentiel prometteur de celui-ci dans l'imagerie du système respiratoire et dans le diagnostic de l'HTAP. Devant les résultats favorables d'innocuité et d'efficacité chez l'animal, une demande d'essai clinique a été complétée et une lettre de non-objection a été obtenue de Santé Canada. Celle-ci a donné le coup d'envoi de l'essai de phase I chez l'humain.

Il n'existe actuellement aucun véritable examen diagnostique pour la détection précoce des anomalies de la circulation pulmonaire. En réalité, il est estimé que la hausse de la tension artérielle pulmonaire est observable seulement à partir du moment où il y a une perte de plus de 50 % du lit capillaire. De plus, c'est à partir de ce moment et de façon indirecte que l'HTAP peut être détectée



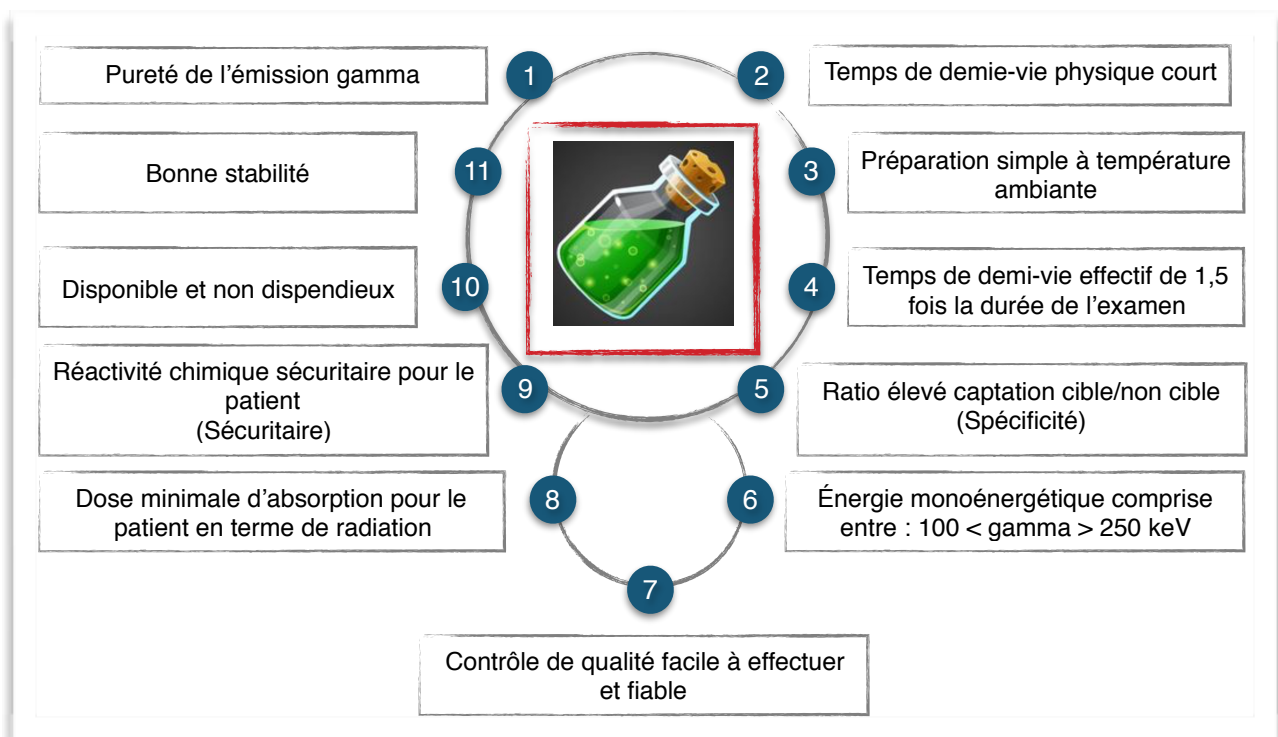
par échographie. Le diagnostic de l'HTAP est souvent fait à un stade avancé de la maladie soit en moyenne 2 ans environ après l'apparition des premiers symptômes. Malheureusement, le diagnostic final repose aujourd'hui sur le cathétérisme cardiaque une intervention invasive et risquée. Une fois le diagnostic posé, le suivi de la progression pourra se faire à l'aide de différents paramètres, dont l'ETT et le test de marche des six minutes. Toutefois, les valeurs prédictives du test de marche sont très controversées dans la littérature en raison de l'existence de plusieurs variables qui peuvent influencer son résultat, dont l'âge et les affections cardiaques [202]. En absence de test de fiable dans l'évaluation de la sévérité et de la progression de l'HTAP, il est maintenant important de développer des outils diagnostiques non invasifs permettant de favoriser un diagnostic précoce et d'assurer un meilleur suivi médical.

Puisque le PB est un radiotracer moléculaire qui est influencé par l'intégrité physique et fonctionnelle de la perfusion pulmonaire, nous pensons que celui-ci peut devenir un marqueur sensible qui sera en mesure de révéler la sévérité de la maladie ainsi que sa progression ou sa régression lors de son suivi. De ce fait, il pourrait être un outil de choix dans l'évaluation de l'efficacité des nouvelles thérapies et pourrait également être utile dans la recherche de l'étiologie de l'HTP. Dès lors, par exemple, il sera possible de déterminer une HTP de type thrombo-embolique chronique par la présence de multiples défauts de perfusion lobaires, segmentaires ou sous-segmentaires dans l'arbre vasculaire pulmonaire.

Cette thèse repose sur l'étude de phase I du produit radiomarqué PB. Ces travaux ont été en mesure de prouver l'innocuité et l'efficacité du PB comme agent diagnostique. Dans son ensemble, ce premier protocole de recherche chez l'homme n'a soulevé aucune préoccupation en matière de sécurité. De plus, il a été également possible de démontrer la capacité du PB à fournir des images de

qualité comparable et même supérieure à celles obtenues en établissement de soins avec les MAAs. D'autre part, l'analyse approfondie des diverses acquisitions a révélé la présence d'un gradient de perfusion pulmonaire, un élément en-soi fort prometteur.

Lors du développement d'un radiopharmaceutique, il est important de prendre en considération plusieurs conditions essentielles. Celles-ci sont énumérées à la figure 30. Dans la situation où un radiotracer satisfait l'ensemble de ces critères, celui-ci sera considéré comme un agent prometteur, efficace, sécuritaire et potentiellement commercialisable. Le PB rencontre ces conditions : voyons en détail pourquoi.



**Figure 30. Énumération des conditions essentielles pour développer un radiopharmaceutique prometteur**

La présence d'un tétrapeptide dans la structure du PB permet à celui-ci de se lier de façon efficace avec le  $^{99m}\text{Tc}$ . Le choix du radionucléide lors du développement d'un radiopharmaceutique est crucial. Il est important de favoriser les émissions gamma les plus pures, et ce en évitant la formation de particules (alpha et bêta). Pour ce faire, il est préférable de sélectionner les radioisotopes qui disposent d'une décroissance par capture électronique ou bien par transition isomérique. Les particules ont la réputation d'être très peu pénétrantes et très ionisantes ce qui aura pour effet d'augmenter les doses de radiations absorbées. Le  $^{99m}\text{Tc}$  atteint son état d'équilibre et de stabilité par transition isomérique, une émission gamma quasi pure de 140 keV (98,6 %) qui assure au PB une dosimétrie favorable dans les valeurs comparables aux autres radiopharmaceutiques du marché. Le choix du technétium métastable comme radionucléide repose également sur le fait que pour réaliser une image de qualité au moyen d'une caméra gamma, il est important de conserver une énergie transmise dans l'intervalle de 100 et 250 keV. Par conséquent, le  $^{99m}\text{Tc}$  avec une émission à 140 keV permet une acquisition optimale à l'aide des caméras gamma standards retrouvées en milieu hospitalier.

Idéalement, le temps de demi-vie effectif d'un radiopharmaceutique devrait être au moins de 1,5 fois la durée de l'examen. Ceci représente un bon compromis entre le désir de vouloir minimiser la quantité de radiations et la maximisation de la dose injectée ce qui permet d'améliorer le nombre de comptes et du même coup la qualité de l'image. La demi-vie d'élimination biologique du PB est de 90 minutes (95 % intervalle de confiance (IC) 65-149), donnant un temps de demi-vie effectif de 72 minutes. La période nécessaire pour effectuer une tomographie est d'environ 30 minutes, par conséquent en prenant ce temps et en le multipliant par 1,5 on obtient un temps de 45 minutes ce qui est en deçà du temps idéal de 72 minutes et moins. Tout compte fait, le PB détient une demi-vie effective favorable remplissant les conditions d'un bon radiopharmaceutique clinique.

Il est important également que le radiotracteur possède une forte spécificité. Celle-ci est calculée par le ratio des taux de captation des régions cibles sur non cibles. Plus ce ratio est élevé, plus le radioligand sera spécifique. En ce qui a trait au PB, le phénomène de premier passage assure une bonne spécificité pulmonaire. Cette spécificité sera temps dépendant et diminuera au fur et à mesure de l'élimination du PB. La captation du PB est représentative de la densité des récepteurs à l'AM, mais également de la distribution spatiale de ceux-ci au sein du poumon. Cependant, le système respiratoire n'est pas le seul site de captation du PB. En effet, le foie, les reins et la vessie constituent d'autres régions où celui-ci est capté. À la suite de son administration, l'intensité de l'activité pulmonaire du PB diminuera en fonction du temps pour laisser place à une augmentation de la captation au sein des organes responsables de l'élimination (foie, reins, vessie). De ces organes considérés comme non-cibles, c'est le foie qui est le plus susceptible de constituer une source de biais. Non négligeable, ce biais pourrait affecter les analyses semi-quantitatives de la captation pulmonaire en raison principalement de la proximité anatomique avec le lobe pulmonaire inférieur droit.

Au contact du rayonnement, s'il y a dommage, une cellule irradiée peut se réparer, mourir ou bien malheureusement muter. Par conséquent pour minimiser ces risques de mutation, il est essentiel de préconiser la plus petite dose possible permettant de réaliser les meilleurs images. Un des objectifs principaux lors de cette phase I était de démontrer la sécurité du PB en matière de radioactivité absorbée. Les données de dosimétries favorables représentent au moment de la commercialisation un avantage concurrentiel important. En l'occurrence, le résultat d'une dosimétrie défavorable aura pour effet de soulever un souci d'innocuité pouvant mener à l'arrêt des études cliniques et même au retrait du radiotracteur.

En ce qui a trait au PB, la dosimétrie observée à la dose maximale de 15 mCi a révélé une dose absorbée de radiation entre 6 à 8 mSv. Les organes les plus touchés étant la vessie (vidange urinaire 4 heures), le foie, les reins et les poumons avec des doses d'absorption radioactive de 28,29 mSv, 25,25 mSv, 23,60 mSv et 8,01mSv respectivement. Pour assurer la protection de la population, les instances réglementaires ont émis des recommandations en ce qui a trait à la dose maximale que devrait recevoir un patient sur une base annuelle et lors d'une simple dose. La section 4.4.3.4 de l'introduction revoit ces recommandations. À la lumière de nos résultats, aucun organe ne reçoit une dose dépassant les avis réglementaires. De plus, la dose pancorporelle absorbée évaluée entre 6 à 8 mSv se retrouve bien en deçà de la limite permise de 30 mSv jugée comme étant sécuritaire. Tout compte fait, le PB est un radiopharmaceutique fiable et sûr qui répond aux exigences réglementaires. Cela représente en soi une étape notable dans le développement du PB et dans la démonstration de son innocuité.

La sécurité du patient est primordiale. Il est donc essentiel que le radiotracer n'entraîne pas d'évènement indésirable majeur ni de réaction immunitaire. Dans cette étude clinique de phase I, deux analyses intérimaires de sûreté et une troisième en fin de protocole ont été effectuées et révisées par un comité de sécurité indépendant. Ces analyses non rapporté aucune préoccupation en ce qui concerne l'innocuité du PB. La concentration maximale administrée aux participants a été de 15 mCi pour un total de 18,5 µg de peptide. À ce dosage, la quasi-totalité des participants a bien toléré l'administration intraveineuse du PB. Toutefois, un seul sujet a affirmé avoir senti un inconfort lors de l'infusion au site du cathéter sous forme de brûlement, et ce durant un court laps de temps.

L'utilisation d'un peptide endogène connu comme vecteur a pour avantage de faciliter l'identification des risques et des effets secondaires probables. Dans le cas du PB, nous voulions porter une attention toute particulière au pouvoir potentiellement vasodilatateur de celui-ci et sur les risques d'hypotension reliés. Par conséquent, les sujets ont été sous surveillance étroite avec un moniteur cardiaque effectuant une prise régulière de la tension artérielle pour une durée approximative de 6 heures. Lors de cette période, aucune variation hémodynamique symptomatique cliniquement significative n'a été enregistrée.

Toutefois, en début de traitement il a été possible d'observer une légère baisse des pressions et puis une hausse de celle-ci à environ 140 minutes post-injection. Néanmoins, ces variations étaient nettement reliées au changement positionnel et au niveau d'activité du participant. Selon le protocole, les participants devaient respecter une position immobile en décubitus dorsal durant une période minimale de 3 heures ce qui entraînait même parfois le sommeil chez certains d'entre eux. Par conséquent, cet état de repos en début de procédure expliquerait cette baisse des tensions artérielles. En revanche, le lever de la restriction d'immobilisation et la reprise des activités normales vers la cent quarantième minute pour la période du dîner aurait eu pour effet contraire de hausser la tension artérielle au repos chez la majorité des participants.

Il est important de mentionner que la variation des tensions artérielles décrite lors de cette phase I n'était pas dose-dépendante (chapitre 8, tableau 1). La réduction maximale moyenne de la tension artérielle observée pour le jour 1 était de -7,4 (-10,3 , -4,4) (moyenne, 95% IC) au niveau systolique et de -9.8 (-13,4 , -6,2) (moyenne, 95% IC) au niveau dyastolique. Face à ces résultats, il est important de garder une certaine prudence, et ce en raison de la population cible du PB qui est composée de personnes plus précaires (embolies pulmonaire, HTP sévère, insuffisance rénale significative, etc.). En outre, dans certaines sous analyses, la chute maximale de la tension artérielle

systolique et/ou diastolique a atteint 15-23 mmHg avec une IC à 95%. Une éventuelle phase II chez cette population pourra confirmer de façon plus certaine la sécurité du PB lors de son administration.

En comparant les graphiques de la variation moyenne des tensions artérielles systoliques et diastoliques avec celui de la fréquence cardiaque moyenne, on remarque alors que la baisse des tensions coïncide avec une diminution de la fréquence cardiaque et qu'à l'inverse une hausse des tensions coïncide avec une augmentation de la fréquence cardiaque. Par conséquent, les variations des tensions semblent être davantage débit-dépendants, ce qui diminue le degré de causalité du PB. En théorie dans le but de maintenir l'homéostasie, la réponse d'une baisse des tensions provoquée par le PB se traduirait plutôt par une hausse des fréquences cardiaques.

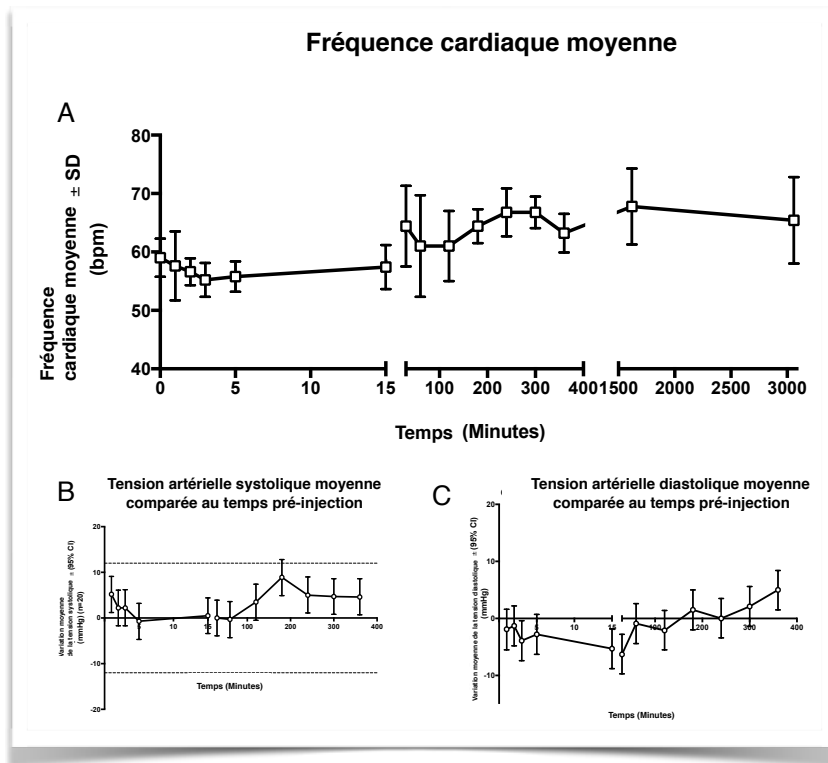


Figure 31. Graphiques de la fréquence cardiaque (A) et de la variation des tensions artérielles systoliques (B) et diastolique (B) en fonction du temps suite à l'administration intraveineuse du PB

D'autre part, les tests de laboratoire d'hématologie et de biochimie, ainsi que le bilan hépatique, le coagulogramme et l'ECG n'ont pas démontré des variations cliniquement significatives durant l'étude.

Par ailleurs, lors de cette étude, 15 des 20 participants ont éprouvé au minimum un effet indésirable. Toutefois, aucun évènement indésirable de nature grave n'a été causé par l'administration du PB. Néanmoins, quelques évènements indésirables d'intensité faible à modérée ont été observés. De ceux-ci, seul l'inconfort au site d'injection lors de l'infusion a été directement relié au PB. L'évènement indésirable le plus fréquemment rencontré auprès des participants a été la céphalée de grade 1 [203] (35%). Il est plus probable que l'état de jeûne prolongé ainsi que l'immobilisation continue des sujets de recherche sur une surface rigide soient à l'origine de ce symptôme. De fait, les céphalées ont été considérées comme probablement non reliées au PB.

Pour faciliter la tâche aux techniciens en médecine nucléaire, il est important que la préparation du radiopharmaceutique soit la plus simple et la plus rapide possible. Une bonne stabilité à l'air ambiant représente un atout majeur. Comme nous le savons la clinique est un monde fait d'imprévus. Dès lors, plus le temps de stabilité sera long, plus les heures de préparation et d'administration du produit seront flexibles. Le PB est livré sous forme d'une trousse diagnostique contenant un total de deux fioles facilement reconstituables. La stabilité à l'air ambiant du PB marqué a été évaluée à 3 heures après préparation avec une pureté radiochimique de plus de 95 %. Cette stabilité de 3 heures ainsi que la manipulation simple du kit diagnostique représentent une fois de plus des éléments favorables au PB pour une éventuelle commercialisation.

Puisque la reconstitution du radiopharmaceutique se fait en milieu hospitalier et que la composition du produit peut varier entre les préparations, il est alors important d'effectuer des tests



d'assurance qualité dans le but d'obtenir les meilleures images possibles et éviter les radiations inutiles. Pour ce faire, un test de contrôle accessible et facile à exécuter doit être offert. Pour ce qui a trait au PB, la qualité du marquage peut être vérifiée en centre hospitalier par une méthode de chromatographie sur couche mince. Cette méthode consiste à déposer dans la partie inférieure d'un papier de chromatographie coupé en languette une goutte d'échantillon qui subira une migration sous l'effet d'un solvant. L'analyse de la répartition de la radioactivité sur la languette permettra au moyen d'un rapport de déterminer la pureté radiochimique du produit.

Tout compte fait, le PB satisfait l'ensemble des critères pour être un bon radiotraceur clinique commercialisable. Toutefois, avant d'atteindre les tablettes, il sera important de déterminer l'efficacité et le positionnement de celui-ci au sein de l'offre clinique des examens d'imagerie. À ce jour, le plus proche et l'unique compétiteur du marché sont les MAAs.

En effet, la scintigraphie pulmonaire aux MAAs est le seul test diagnostique en médecine nucléaire destiné au système respiratoire dont le rôle est de déterminer la présence d'embolies. Ce type d'acquisition se base essentiellement sur des principes physiques, ce qui diverge des autres examens en médecine nucléaire qui permettent principalement l'imagerie de processus métaboliques dynamiques et spécifiques. Les MAAs qui représentent l'examen de référence en clinique comportent certains avantages et inconvénients lorsqu'ils sont comparés au PB. Selon nos données précliniques et cliniques obtenues sur le PB et tout comme les MAAs, ces deux agents diagnostiques sont en mesure de déceler une perte perfusionnelle mécanique secondaire à une embolie pulmonaire. Toutefois, la forte présence des récepteurs à l'AM au niveau de la microcirculation donne un avantage au PB. En effet, celui-ci pourra non seulement détecter le blocage de grosses artères, mais également des petites artérioles pulmonaires.

D'autre part, un autre avantage du PB réside dans le fait que les acquisitions peuvent se faire sans craindre de perturber davantage la perfusion pulmonaire. Cet aspect du PB représente un avantage indéniable en comparaison avec les MAAs étant donné que ceux-ci peuvent obstruer en moyenne plus de 300 000 capillaires (1 sur 1000) par injection provoquant ainsi une embolisation iatrogène des artérioles précapillaires du parenchyme pulmonaire. En se collant au récepteur de l'AM, le PB, une petite molécule de 4270,82 Da, n'affecte en rien la dynamique circulatoire assurant ainsi une meilleure sécurité pour les patients. Par conséquent, le PB pourra être utilisé chez des personnes avec des antécédents médicaux d'HTAP sévère et de shunt cardiaque droite-gauche des affections pour lesquels les MAAs sont contre-indiqués.

Le PB est un produit 100 % synthétique de taille fixe ce qui est également un avantage en soi. En opposition, celle des MAAs peut varier entre 10 et 90  $\mu\text{m}$  lors d'une même injection ce qui complique la reproductibilité de l'examen. De plus, en raison de leur origine, les MAAs appartiennent à une classe de produits que l'on nomme biologique. En effet, ceux-ci sont des dérivés d'albumine sérique humaine provenant de dons de sang. Par conséquent, le risque de transmission d'agents pathogènes et infectieux est non nul avec ce type de produit, faisant ainsi du PB un radiotraceur beaucoup plus sécuritaire.

L'imagerie découlant de l'administration du PB permet également de donner davantage d'informations cliniques comparativement aux MAAs au niveau de l'intégrité de l'endothélium, la fonctionnalité vasculaire, ainsi que sur la densité de distribution des récepteurs à l'AM. Quoiqu'il en soit, les MAAs possèdent un avantage intéressant relativement au PB. À la suite de l'administration de ceux-ci, quasi 100 % de la dose se retrouvera au niveau pulmonaire. Cet avantage permet d'obtenir une grande spécificité rendant les analyses semi-quantitatives plus faciles tout en diminuant les biais.

Au niveau du marché des MAAs en Amérique du Nord, c'est la compagnie Draximage® qui possède le monopole. En 2014, ceux-ci ont augmenté de plus de 2000% le coût d'une fiole passant de 26 \$ US à 561 \$ US par unité [204]. En sachant que le coût de production à basse échelle d'une fiole de PB est de 1 \$ CAN, il est fortement envisageable de pouvoir concurrencer Draximage® dans ce marché monopolistique. Il faut dire que le PB tire son avantage du fait qu'il est un synthétique ce qui favorise des coûts de production à la baisse.

	<b>MAAs</b>	<b>PulmoBind</b>
Diagnostic d'une perte perfusionnelle mécanique (Embolies pulmonaires)	++++	++++
Potentiel diagnostique d'une perte fonctionnelle vasculaire (Imagerie moléculaire)	-	++++
Blocage >300 000 artérioles par examen	OUI	NON
Se lie à son récepteur endothélial sans perturber le flux sanguin pulmonaire	NON	OUI
≈ 100 % de la dose injectée se retrouve au niveau de l'organe cible	++++ (100%)	++ (58%)
Potentiel infectieux (un dérivé sanguin humain)	+	-
Coût	++++	+

**Tableau 16. Tableau comparatif entre les agents d'imagerie MAAs et PulmoBind**

Lors de la phase I, les images obtenues chez nos 20 participants ont été comparées aux images captées en clinique avec les MAAs. Cette analyse effectuée par une équipe de nucléistes a démontré qu'à une dose de 15 mCi les images générées par le PB étaient équivalentes et même supérieures aux MAAs, et ce jusqu'à 60 minutes après injection. Tout compte fait, à la lumière de ces résultats et de l'ensemble des avantages énumérés ci-haut, le PB possède un potentiel comme

produit de substitution des MAAs en clinique. Bien entendu, substituer les MAAs est somme toute excellent en soi, mais en quoi le PB pourrait faire plus ?

À la suite de la phase I, nous avons examiné les données obtenues dans le but de cibler des paramètres pertinents qui pourraient être utiles pour évaluer la fonction respiratoire en clinique. De ces paramètres nous avons retenu la captation maximale pulmonaire après un simple passage ( $C_{max}$ ) et l'aire sous la courbe de la captation pulmonaire (CP) en fonction du temps ( $AUC_{cp}$ ). À la suite de diverses analyses, ces paramètres ont démontré chez l'humain une faible variabilité, avec un  $C_{max}$  de  $58 \pm 1\%$  et une  $AUC_{cp}$  de  $9089 \pm 344$ . De plus, ceux-ci ont également fait l'objet de tests de corrélation avec des paramètres anthropométriques, de laboratoires et de fonction respiratoire. Pour l'ensemble de ces variables l'âge, le poids, la taille, la créatinine, le VEMS et CVF corrélaient avec l' $AUC_{cp}$  et seuls l'âge, le VEMS et la CVF corrélaient avec le  $C_{max}$ . Une fois ces données indexées en fonction de la taille et du poids, seul l'âge maintenait une corrélation significative inversement proportionnelle avec le  $C_{max}$  ( $-0,479$   $p=0,038$ ) et l' $AUC_{cp}$  ( $-0,485$   $p=0,035$ ). Ces corrélations sont évidemment une tendance reposant sur un petit échantillon. Un autre élément à considérer est qu'au sein de cet échantillon les deux sujets les plus vieux en âge étaient également les deux seules femmes du groupe. Par conséquent, le genre peut être une cause de biais dans cette interprétation. Pour éclaircir et confirmer ces corrélations, des études supplémentaires et un échantillon de plus grande taille seront nécessaires. Ces paramètres seront repris lors de l'étude de phase II dont le but sera d'analyser les variations dans l'état pathologique de l'hypertension artérielle pulmonaire. D'après ce que nous savons à ce jour et en raison des données précliniques, nous devrions observer de façon hypothétique une baisse du  $C_{max}$  ainsi que de l' $AUC_{cp}$ .

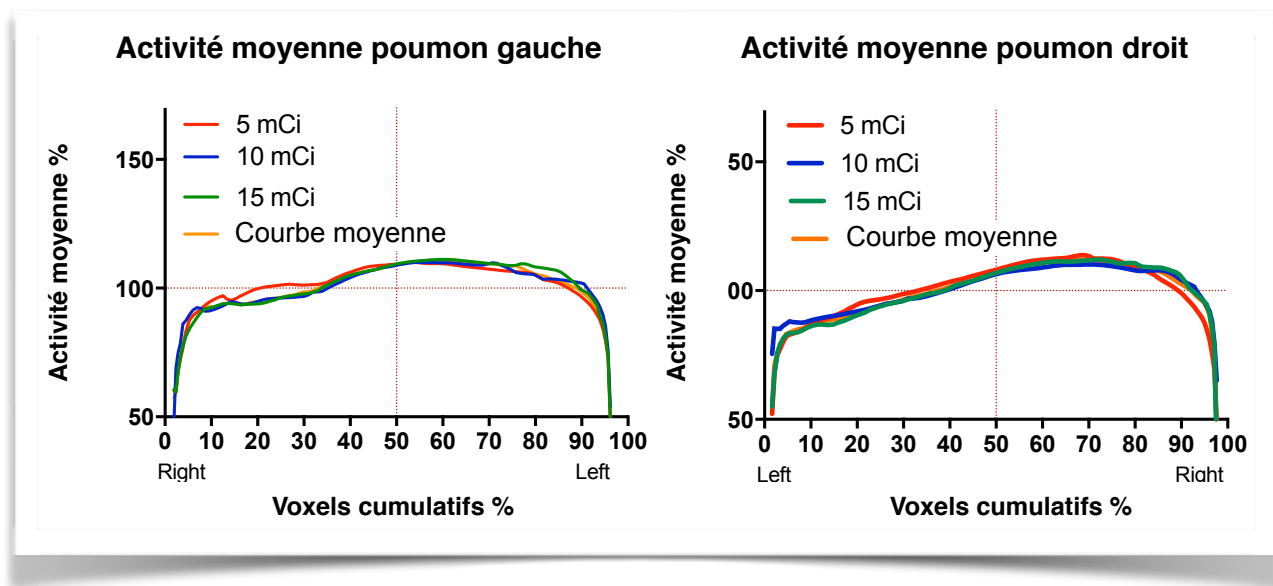
Nous avons également analysé le volume pulmonaire en fonction de l'intensité de l'activité et la distribution spatiale du PB en fonction des axes dorso-ventral (DV), caudo-crânial (CC) et médio-latéral (ML). Quant à l'approche utilisée pour évaluer la distribution spatiale de la perfusion, elle représente une toute nouvelle méthode reposant sur l'activité relative et l'activité cumulée en fonction des voxels cumulés. La géométrie pulmonaire peut varier d'un individu à l'autre. Pour ces motifs, l'utilisation du cumulatif des voxels a permis lors des analyses de réduire la possible variabilité interindividuelle.

Au cours des dernières années, des études chez l'humain employant des traceurs de type physique comme les MAAs en TEMP et des agents de contrastes intravasculaires en IRM ont réussi à imager l'hétérogénéité perfusionnelle [85]. Pour notre part, nos travaux ont également été en mesure de démontrer la présence d'un gradient pulmonaire, et ce en utilisant pour la toute première fois un radiotraceur métabolique et une toute nouvelle méthodologie d'analyse.

Celle-ci se base sur le calcul de l'activité cumulée et de la concentration relative en fonction du cumulatif des voxels. La première approche implique que si 25 %, 50 % ou bien 75 % de l'activité cumulative est atteinte en moins de 25 %, 50 % et 75 % des voxels cumulatifs respectivement, il subsiste alors un gradient. Dans la deuxième approche, la moyenne de l'activité par voxel pour une tranche donnée est comparée à la moyenne obtenue pour l'ensemble des tranches. Les poumons sont alors divisés en deux compartiments de même taille et la concentration relative moyenne de ces deux compartiments est comparée. Ces deux nouvelles méthodes ont pour but d'éviter les biais qui concernent les différences interindividuelles, les variations de dose et les variations des temps d'acquisition.

Ces stratégies d'analyses ont démontré un gradient en dorso-ventral ( $VAQ25\% = 20,9 \pm 0,4$ ) plus important comparativement à celui observé en caudo-crânial ( $VAQ25\% = 23,3 \pm 0,2$ ). Une administration du traceur en position debout aurait probablement favorisé l'inverse. De plus, dans une plus faible proportion, il a été possible de démontrer l'existence d'une hétérogénéité en médio-latéral. Dans les études de comparaison entre l'homme et la race canine, ces méthodologies ont permis de mettre en évidence une similarité des gradients pulmonaires en dorso-ventral et en caudo-crânial. Toutefois, ces gradients semblables sont de plus grandes intensités chez le chien probablement en raison de la différence qui existe au niveau de la posture et de la géométrie de l'arbre pulmonaire entre ces deux espèces. Ces dissemblances peuvent également expliquer la disparité plus marquée du gradient de l'axe médio-latéral entre le chien et l'humain.

Pour effectuer l'analyse des gradients, la tomographie réalisée à 90 minutes post-injection a été utilisée. Malheureusement, l'étude des gradients à des temps variables n'a pas été possible, par conséquent nous ne savons pas à ce jour si les gradients obtenus sont temps dépendants ou indépendants. Toutefois, si on considère que la captation pulmonaire du PB au TEMP décroît de façon linéaire et uniforme en fonction du temps d'élimination du PB et de la décroissance radioactive du  $^{99m}\text{Tc}$ , le temps d'acquisition de l'image ne devrait pas nuire à l'analyse des gradients. Cependant, en raison de la décroissance radioactive rapide du  $^{99m}\text{Tc}$ , une tomographie effectuée rapidement post-injection améliorera la qualité de l'image obtenue et par le fait même les analyses qui en découlent. Pour ce qui est de la variation des doses d'injection, les gradients obtenus sont dose-indépendants comme le démontre la figure 32.



**Figure 32. Graphique de l'activité moyenne en fonction du cumulatif de voxels pour les poumons droit et gauche en fonction de différents dosages du PB**

Tout compte fait, à l'aide de l'imagerie TEMP et du PB, nos études confirment aujourd'hui, l'existence d'un gradient de perfusion gravitationnel et isogravitationnel dans les axes dorso-ventral, caudo-crânial et médio-lateral et ce autant chez l'homme que chez le chien.

La présence de ces gradients a suscité ces dernières décennies beaucoup d'interrogations dans le milieu scientifique. Plusieurs chercheurs ont tenté d'évoquer des hypothèses pouvant expliquer le pourquoi d'un tel phénomène physiologique. La section introduction de cette thèse fait mention des divers mécanismes passifs et actifs pouvant modifier la dynamique circulatoire au niveau pulmonaire, et de ceux-ci nous retrouvons : le débit cardiaque, la compliance pulmonaire, la résistance pulmonaire, la capacité du recrutement vasculaire, la gravité, la posture, les volumes pulmonaires, la présence d'un état hypoxique, les facteurs endothéliaux (NO-PGI<sub>2</sub>-EDHF) et le modèle fractal. Ces mécanismes réunis expliquent en grande partie le patron de la distribution sanguine et ces gradients. Nous savons aujourd'hui qu'une perturbation de cette distribution spatiale

peut être reliée à une pathologie tel que l'HTAP [205]. Malheureusement, de nos jours, les données relatives aux gradients de perfusion ne sont pas utilisées en imagerie diagnostique. Pourtant, ces paramètres pourraient fournir une aide supplémentaire aux cliniciens dans l'évaluation de la fonction pulmonaire.

Dans un autre ordre d'idées, l'analyse de la fréquence de distribution de l'activité sous forme d'histogramme permet de bien caractériser la captation pulmonaire du PB. On observe une diminution de la captation pulmonaire du PB et une élévation du nombre de voxels froids ce qui se traduit par une déformation de la courbe vers la gauche. En revanche, une augmentation de la captation déplacera le graphique du côté droit. Toutefois, cette technique ne permet pas de déterminer la distribution de l'activité de façon spatiale. Pour ce faire, une étude sur les gradients serait plus pertinente. Dans une approche clinique, l'exploration de l'intensité de l'activité en fonction du volume pulmonaire pourrait être également utilisée dans le but de sonder la réponse positive ou non d'un patient à son traitement. Dans ce cas, l'observation d'une augmentation du nombre de voxels chauds à la suite de l'initiation d'une thérapie pourrait indiquer l'efficacité de celle-ci. La figure 33 démontre d'autres facteurs pouvant également affecter cette courbe. De ceux-ci nous retrouvons : l'expression du récepteur à l'AM, le taux circulant d'AM, l'embolie pulmonaire, le débit cardiaque, la présence d'un shunt cardiaque et le recrutement vasculaire.



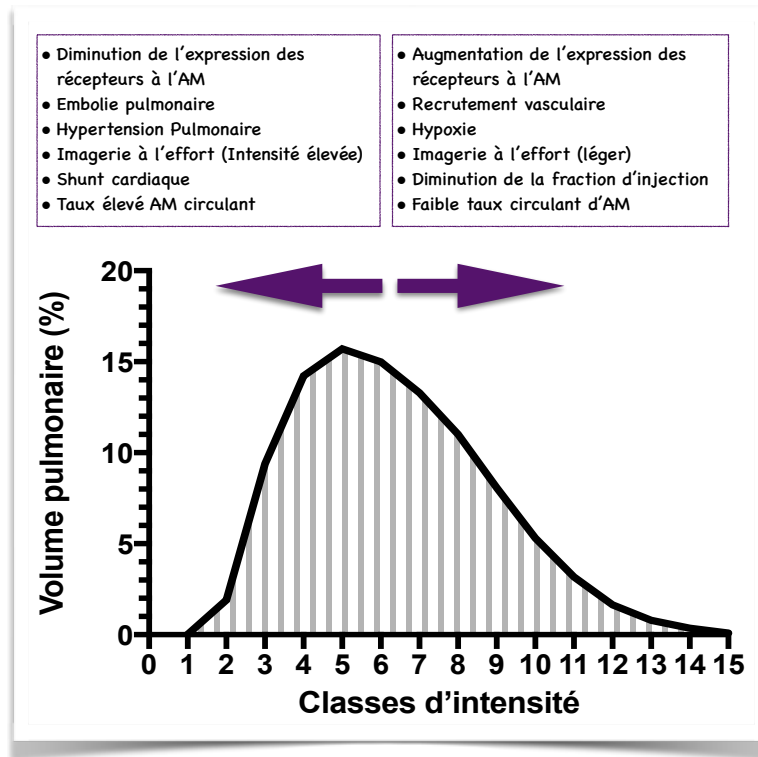


Figure 33. Illustration de la fréquence de distribution du  $^{99m}\text{Tc}$  PulmoBind chez l'humain

Ce graphique représente le pourcentage du volume pulmonaire en fonction de l'intensité de l'activité. Les classes sont numérotées de 1 à 15 divisant la valeur de l'intensité du voxel le plus chaud en 15 tranches égales, et ce de l'activité minimale (0%) à l'activité maximale (100%). Énumération des divers facteurs pouvant affecter la forme de la courbe.

Pour ce qui est de l'HTAP et de son influence sur cette courbe, l'équipe de Fukuchi et al. a effectué dans les années 2000 une analyse quantitative de la perfusion pulmonaire chez des patients souffrants d'HTAP [205]. L'imagerie obtenue à cette époque en TEMPS a bien démontré une perte inégale du lit vasculaire sous la forme de motifs tachetés. Par conséquent, à la lumière de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une déformation de la courbe intensité/volume pulmonaire vers la gauche est attendue en raison de l'augmentation des pixels froids due aux pertes inégales de la perfusion.

## 10.1 Facteurs pouvant influencer la captation pulmonaire du PB

### 10.1.1 Récepteurs

Par l'utilisation d'un dérivé marqué de l'AM, notre laboratoire a pu confirmer pour la première fois chez l'humain la forte expression des récepteurs de l'AM au niveau de l'arbre vasculaire pulmonaire. D'autre part, ces travaux valident également chez l'humain le statut du poumon en tant que site primaire de clairance pour l'AM. Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a confirmé la distribution homogène des récepteurs de l'AM au travers du tissu pulmonaire. Une dispersion non uniforme de ces récepteurs à l'état physiologique pourrait introduire une forme de biais qui pourrait influencer les résultats obtenus dans le cadre de nos analyses. Ceux-ci pourraient dès lors ne pas refléter tout à fait la distribution spatiale de la perfusion pulmonaire. Néanmoins, les données recueillies sur l'intensité de l'activité du PB en fonction du volume pulmonaire chez le chien et l'humain ont révélé une courbe unimodale en forme de cloche, démontrant ainsi une activité selon la loi normale. Ce résultat suggère donc une distribution normale du récepteur de l'AM au sein de la vasculature pulmonaire.

Malheureusement, à ce jour, nous ne savons que très peu de choses en ce qui concerne les différents facteurs et mécanismes pouvant exercer une influence sur la distribution et la régulation des récepteurs de l'AM dans un contexte physiologiquement ou bien pathologique chez l'humain. Somme toute, d'autres études seront nécessaires pour éclaircir les modalités d'expression de ces récepteurs.

### 10.1.2 Le taux d'adrénomédulline circulant

Les concentrations plasmatiques d'AM sont augmentées dans certaines pathologies (cancer, diabète, obésité, maladie rénale et hépatique, sepsis) [206]. La compétition de notre produit pour la liaison au récepteur avec l'AM endogène ( $AM_{\text{endo}}$ ) n'a pas encore vraiment été caractérisée in vivo. Toutefois, des études précliniques in vitro ont déterminé une plus faible affinité du PB pour les récepteurs à l'AM comparativement à l'AM. Par conséquent, une compétition au site de liaison pourrait faire diminuer la captation pulmonaire de notre produit.

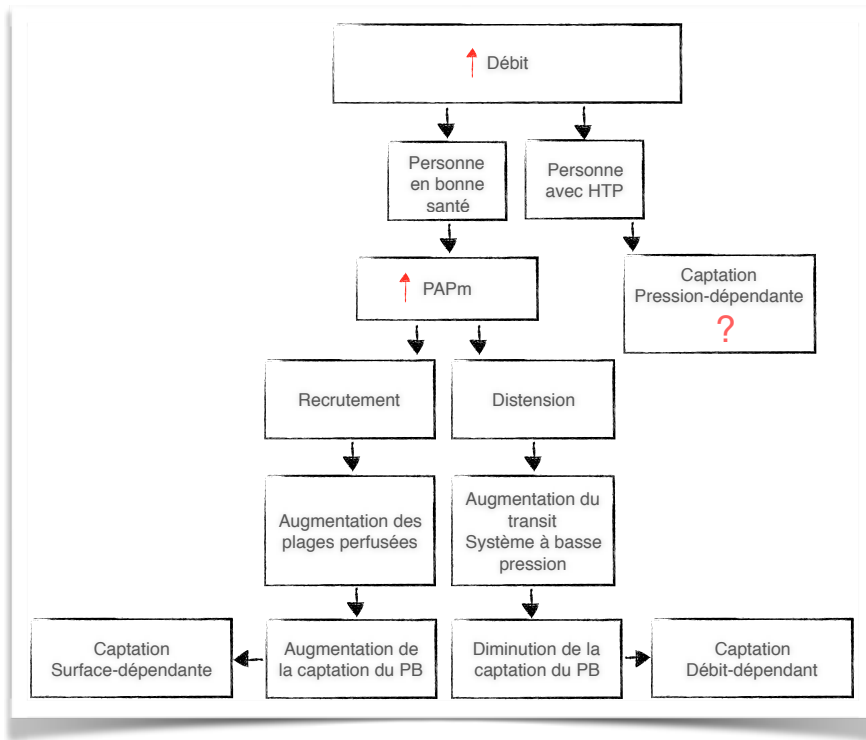
D'un autre côté, l'impact du PB sur les taux plasmatiques d' $AM_{\text{endo}}$  n'a également pas fait l'objet d'étude. De façon hypothétique, on pourrait penser que l'occupation des récepteurs par le PB pourrait influencer les concentrations  $AM_{\text{endo}}$  à la hausse en raison de la diminution de sa clairance. Cependant, il est peu probable que cette hausse soit significative, en regard de la faible dose du PB administrée (18,4  $\mu\text{g}$ ). De plus, une hausse significative de la concentration sérique d'AM aurait eu pour conséquence d'amener une plus grande proportion d'évènements indésirables lors de l'étude clinique de phase I.

### 10.1.3 Le facteur H (FH)

Le facteur H constitue une protéine de transport de l'AM au niveau plasmatique. À ce jour, nous ne savons pas si notre produit, le PulmoBind, est affecté par le FH. Une augmentation des concentrations sanguines du FH, pourrait jouer sur la biodisponibilité de notre marqueur et par le fait même modifier les taux de captation pulmonaire. Néanmoins, selon Sim et al, la liaison hydrophobique de l'AM et du FH nécessiterait la présence des résidus tyrosines des positions 1 et 52 [114]. En ne possédant pas la tyrosine en position 1, le PB a peu de chance d'avoir une interaction avec le FH, cependant d'autres études seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

#### 10.1.4 Le débit circulatoire et la pression artérielle pulmonaire

L'impact des divers paramètres hémodynamiques sur le taux de captation pulmonaire du PB reste encore à élucider. De façon hypothétique chez un individu en santé, l'élévation du débit cardiaque droit entraînera une augmentation du recrutement vasculaire et une majoration de la distension des vaisseaux. Par conséquent, il y aura une élévation de la surface de contact qui favorisera une hausse de la captation du PB (surface-dépendante) et une baisse du temps de transit qui en revanche diminuera les chances de celui-ci de se lier à l'endothélium vasculaire (débit-dépendant). De plus, est-ce que la captation est pression dépendante ? Nous pouvons avancer qu'une augmentation importante de la pression microcirculatoire (capillaire) entraînera de l'oedème pulmonaire et une modification des forces de cisaillement endothéliales. Ces modifications auront pour répercussion d'affecter les fonctions endothéliales et par le fait même possiblement la captation du PB. Toutefois, dans un contexte physiologique, une élévation de la pression de façon non-excessive découlera d'une autorégulation de la pression par les capillaires ce qui va surtout modifier le débit. D'autres études seront nécessaires au niveau pulmonaire pour bien comprendre les impacts des variations hémodynamiques sur la captation du PB.



**Figure 34. Effet hypothétique des variations hémodynamiques sur la captation du PB**

De façon hypothétique chez une personne en bonne santé, l'élévation du débit cardiaque entraînera une augmentation du recrutement vasculaire et une majoration de la distension des vaisseaux. Par conséquent, il y aura une élévation de la surface de contact qui favorisera une hausse de la captation du PB (surface-dépendant) et une baisse du transit qui en revanche diminuera les chances du PB de s'accrocher à l'endothélium vasculaire (débit-dépendant). Est-ce que la captation est également pression dépendante ?

### 10.1.5 Taux de marquage

Un faible taux de marquage indique une plus grande proportion de colloïdes ou de technétium libre dans le mélange reconstitué. Par conséquent, ceci favorisera une captation pulmonaire à la baisse. Le technétium libre présent en solution pourra être visible à l'imagerie par sa captation au niveau de certains organes non-cibles spécifiques telles que : la thyroïde, les glandes salivaires et l'estomac.

### 10.1.6 Mode de détection

L'analyse semi-quantitative des gradients en TEMP n'est pas chose facile et peut entraîner un nombre non négligeable de données faussées. Une des principales sources de biais en TEMP est sans aucun doute sa faible résolution en comparaison au scan et à l'IRM. Par conséquent, ce

désavantage occasionnera ce qu'on appelle l'effet du volume partiel et l'effet de contour. En d'autres mots, en raison de cette résolution spatiale limitée du système TEMP, la distribution de l'activité reconstituée au pourtour du poumon sera floue. Ces voxels impliqués dans le périmètre fournissent des valeurs avec un coefficient de variation élevé, qui ne sont pas nécessairement corrélées à une hétérogénéité de l'activité pulmonaire. Pour ces motifs, certains groupes de recherche retirent une couche de voxel en périphérie du poumon segmenté créant ainsi un volume pulmonaire plus petit permettant de réduire cet effet de contour. En ce qui a trait à notre nouvelle méthodologie d'analyse, les approches utilisées (activité/voxels cumulatifs et concentration relative) permettent de diminuer les effets de contours. Ces analyses se basent sur des moyennes et des cumulatifs qui sont très peu affectés par les voxels d'extrémités puisqu'ils représentent une infime partie du nombre de voxels total lors des calculs.

Un autre biais non négligeable dans cette étude est la non-correction des images pour l'atténuation. Par conséquent, ceci peut avoir comme effet de surestimer ou bien sous-estimer les données réelles. Selon les recherches de 1997 d'Almquist et al. utilisant des MAAs, la comparaison des images non corrigées par opposition à celles corrigées pour l'analyse du gradient a démontré une sous-estimation des données en dorso-ventral (gradient gravitationnel) et une surestimation des résultats en caudo-cranial et en médio-latéral (gradient non gravitationnel) [183]. L'Institut de Cardiologie de Montréal est maintenant équipé de ce qu'on appelle un TEMP-CT, par conséquent il est possible actuellement de corriger les images pour l'atténuation. Dans un avenir rapproché, il serait intéressant d'évaluer l'impact d'une correction d'atténuation sur les divers paramètres étudiés dans cette thèse.

Les mouvements respiratoires et cardiaques réduisent les performances des analyses qualitatives et quantitatives de l'imagerie d'émission en induisant des artéfacts significatifs [207]. Au moment de nos analyses, aucune correction pour le mouvement respiratoire et cardiaque n'a été apportée. Toutefois, la solution pour éviter cette source de biais réside dans l'application d'algorithmes complexes pouvant permettre la synchronisation des images en fonctions des divers mouvements thoraciques. Pour ce faire, trois outils peuvent être utilisés en parallèle au moment de l'examen: l'ECG, le moniteur à impédance et/ou la spirométrie. Ceux-ci font l'analyse du mouvement dans le but de corriger les images pour une analyse quantitative plus juste.

### **10.1.7 Le vieillissement, le genre et l'obésité**

Comme nous avons vu en introduction, le vieillissement ainsi que l'obésité peuvent jouer un rôle important dans la modification des volumes pulmonaires. En plus d'affecter ces volumes, le vieillissement affectera à la baisse l'expression des RAMP2 au niveau vasculaire [167]. Pour confirmer ces changements physiologiques avec l'âge, Levin et al. ont étudié la perfusion pulmonaire à l'aide de l'IRM. Conclusion de cette étude : ils ont observé une augmentation significative de l'hétérogénéité perfusionnelle qui corrélait avec le vieillissement [208]. Un autre élément qui peut être un facteur de variabilité est le sexe. En effet, il a été prouvé qu'il existait une stimulation de l'expression des RAMP2 par les hormones féminines circulantes [168]. Tout compte fait, le vieillissement, le genre et l'obésité pourront influencer sur la captation du PB et sur sa distribution spatiale. D'autres études seront nécessaires afin de caractériser l'impact relatif de ces facteurs sur imagerie obtenue à l'aide du PB.

### **10.1.8 L'étiologie de l'hypertension pulmonaire**

L'artériopathie diffère d'une étiologie à l'autre dans le cas de l'HTP. Par conséquent, le remodelage de l'endothélium se fera de façon différente, ce qui aura un impact direct sur l'expression des récepteurs à l'AM et la capatation du PB au niveau pulmonaire.



## **10.2 Perspectives**

### **10.2.1 TEP-Scan**

Des études sont en cours pour rendre possible le marquage du PB avec le Fluor-18. Le Fluor-18 est un radioisotope émetteur de positrons ( $\beta^+$ ) possédant un temps de demi-vie d'un peu moins d'une heure et cinquante minutes qui permet des acquisitions en TEP-Scan. Beaucoup moins accessible et beaucoup plus coûteux que l'imagerie en TEMP, le TEP-Scan est une technique caractérisée par une meilleure résolution spatiale et temporelle, par un bruit de fond plus faible et par sa capacité de corriger pour l'atténuation. Somme toute, il en résulte une meilleure quantification, une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité. L'utilisation du PB en TEP-Scan rendra plus précises les analyses quantitatives des gradients et des taux de captation pulmonaire. Quant aux diverses questions sans réponse émergeant de cette thèse, quelques-unes d'entre elles pourraient bien être répondues par ce mode d'acquisition.

### **10.2.2 Administration du PB dans diverses conditions pathologiques**

À la lumière de cette thèse, nous savons maintenant que le PB peut être utilisé de façon sécuritaire en administration intra veineuse chez l'humain. Toutefois, beaucoup reste à faire. En effet, la démonstration de l'efficacité du PB dans le diagnostic de l'HTAP n'est pas encore prouvée et plusieurs études cliniques se penchant sur diverses conditions d'administration seront nécessaires. Le tableau ci-dessous propose un ensemble de pistes à explorer dans les prochaines années pour mieux caractériser l'efficacité et le potentiel du PB.

	Injection Décubitus dorsal	Injection Position debout	Injection Position assise
Test au repos	Fait (publication)	Non fait	Non fait
Test à l'effort	Non fait	Non fait	Non fait
Test + scintigraphie ventilatoire	Non fait	Non fait	Non fait
Test au repos Patients HTAP	Fait Groupe 1-4 (publication)	Non fait	Non fait
Test à l'effort Patients HTAP	Non fait	Non fait	Non fait
Test + scintigraphie ventilatoire Patients HTAP	Non fait	Non fait	Non fait

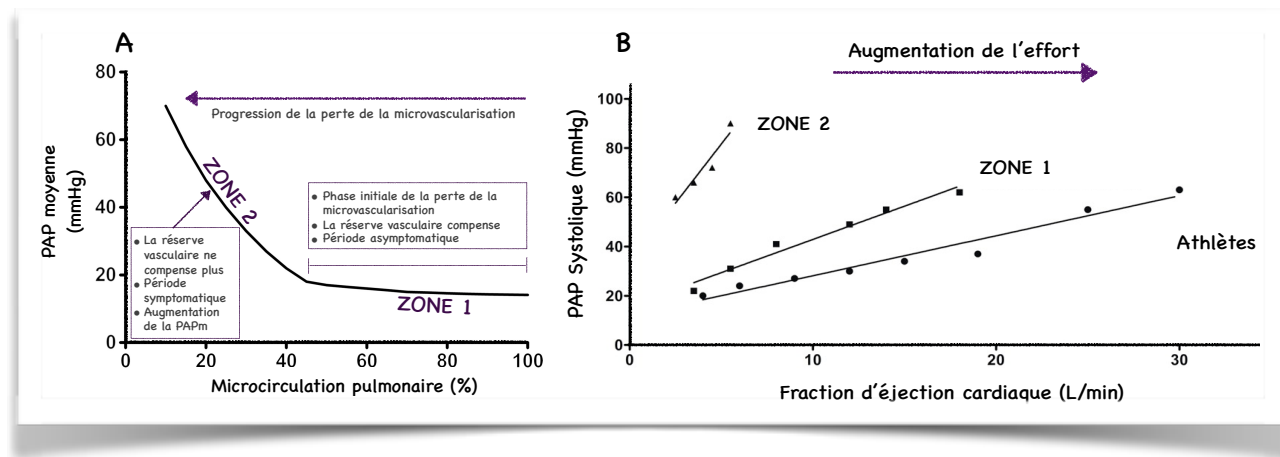
**Tableau 17. Perspective des études cliniques à venir dans le but de mieux caractériser la captation pulmonaire du PB**

### 10.2.3 Test à l'effort

Notre laboratoire a démontré à l'aide d'une technique de dilution d'indicateurs multiples, l'élévation presque linéaire de la surface vasculaire métaboliquement active lorsque le flot sanguin était triplé à l'effort chez le chien [170]. Cette technique a pu donc confirmer la présence d'une réserve vasculaire pulmonaire pouvant pallier l'augmentation des débits cardiaques. D'autre part, il est important de souligner que le recrutement vasculaire favorisera une homogénéisation de la perfusion pulmonaire réduisant ainsi la composante gravité-dépendant dans un état physiologique.

Comme mentionné à quelques reprises, l'HTAP est caractérisée par une destruction des artéioles et une diminution progressive des capacités de recrutement vasculaire. Les premiers symptômes apparaissent très tardivement dans la maladie et coïncident avec le moment où la perte du lit capillaire avoisine les 50 %. À ce stade, les patients ne réussissent plus à compenser cette altération de la microvascularisation (figure 35, zone 2) et les pressions artérielles pulmonaires

s'élèvent. Toutefois, comme nous le démontre la figure 35 B, ces patients en période de latence (zone 1) possèdent une plus faible réserve et par conséquent à l'effort ils feront grimper plus rapidement leur PAPs. La dynamique circulatoire changera promptement et pourra de façon hypothétique affecter les gradients et le taux de captation de notre produit. Bref, en prenant en considération ces faits, il devient logique que le meilleur moyen pour diagnostiquer de façon précoce l'HTAP soit par une évaluation de l'état de santé à l'effort. D'autres études seront nécessaires pour valider cette hypothèse.



**Figure 35. Illustration de la PAPm en fonction de la perte du lit capillaire et de l'effort dans l'HTP**

**Illustration de la PAPm en fonction de la perte du lit capillaire dans l'HTP (A). La zone 1 démontre la phase initiale de la maladie durant laquelle la réserve vasculaire compense pour la perte du lit capillaire. Zone 2, la personne malade atteint un point limite de non-retour durant lequel la réserve ne suffit plus à pallier, c'est à ce moment précis que la PAPm s'élève progressivement et que le patient deviendra de plus en plus symptomatique. Illustration de la PAPm en fonction de l'augmentation de la fraction d'injection chez un athlète, dans la phase précoce de l'HTP (zone 1) et la phase tardive (zone2) (B). En raison de la diminution progressive de la réserve vasculaire, les personnes atteintes d'HTP verront leur PAPm augmenter de façon plus importante à l'effort. Adaptée de Lau et al. [209]**

#### 10.2.4 Test lors d'un changement positionnel

Un autre élément à explorer est sans aucun doute la distribution spatiale du PB lorsque celui-ci est injecté dans une position différente que celle en décubitus dorsal. Lau et al. ont bien caractérisé en 2014, les variations de la dispersion des MAAs lors d'une administration assise

comparée à couchée [201]. L'étude avait pu démontrer auprès des sujets sains une augmentation du gradient CC lorsque le produit était injecté en position assise. Chose impressionnante, les mêmes essais, mais chez des personnes atteintes d'HTP, ont révélé une absence de variation du gradient CC entre les deux types d'administration confirmant ainsi une perte de la redistribution gravité-dépendante dans l'état pathologique de l'HTP [201]. Cette étude ne faisant que l'analyse de l'axe CC, il serait intéressant de poursuivre celle-ci avec une exploration basée sur les autres axes (DV et ML) et cette fois-ci bien évidemment en utilisant le PB.

### **10.2.5 Test de ventilation/perfusion**

À ce jour, aucune analyse de perfusion/ventilation n'a été réalisée avec le PB. Le fait de pratiquer une ventilation permet de rechercher la présence de défauts concordants ou discordants « mismatch » sur des critères de localisation et d'étendue. Le diagnostic dans le cas d'une embolie pulmonaire repose sur l'existence de défauts de perfusion non retrouvés en ventilation. Dans le but un jour de remplacer les MAAs, des études comparatives en ventilation et perfusion en utilisant le PB devront être fait.

### **10.2.6 Le diagnostic de l'embolie pulmonaire**

Environ 600 000 patients sont diagnostiqués d'une embolie pulmonaire par année, et ce aux États-Unis seulement [210]. Un des intérêts potentiels majeurs du PB est le diagnostic de l'embolie pulmonaire aiguë. Les études précliniques ont bien démontré le potentiel diagnostique du PB pour l'embolie pulmonaire. C'est lors des études de phase II que la capacité du PB à imager les déficits perfusionnels chez l'humain s'est toutefois confirmée. Lors de cette étude, 30 patients avec HTP ont été enrôlés, 23 patients avec une HTAP et 7 patients avec une HPTEC. Pour les sujets HPTEC, 7/7 ont été interprétés comme ayant des défauts de perfusion segmentaire compatibles avec une

embolie pulmonaire, et pour l'HTAP il s'agissait de 2/23 sujets. Il a même été possible avec un sujet du groupe HPTEC de comparer l'analyse pulmonaire par MAA obtenue précédemment à celle du PB. Le PB a réussi chez ce sujet à détecter de multiples défauts de perfusion segmentaire de taille et de distribution similaires aux MAA [211]. Par conséquent, ce résultat donne une perspective d'avenir encourageant pour le PB pour compétitionner les MAA dans le marché du diagnostic de l'embolie pulmonaire.

# Chapitre 11

## Conclusion

Cette phase clinique représente une toute petite portion de la recherche clinique avant une éventuelle mise en marché, il reste encore beaucoup à accomplir. Toutefois, elle marque une étape importante dans la recherche et développement du PulmoBind. En effet, au courant de cette étude, nous avons été en mesure de démontrer l'innocuité et la sécurité de celui-ci ainsi que sa capacité à révéler les gradients pulmonaires et à fournir des images de qualité. C'est avec grand plaisir que ces résultats plus qu'encourageants accordent le feu vert pour la poursuite des essais cliniques. À l'aide des modalités d'analyse développées au cours de la phase I, les prochaines étapes du développement permettront de tester le PulmoBind dans l'état pathologique de l'HTP. Beaucoup d'hypothèses restent à vérifier et énormément de travail attend mes successeurs avant une mise en marché possible du PulmoBind. On peut heureusement constater que cette aventure est très bien commencée.

Est-ce que le PulmoBind sera l'outil tant attendu du monde médical ?

Seul l'avenir nous le dira.

# Annexe 1



---

# **Phase-I study of radio-labeled DFH-12 (PulmoBind) for molecular imaging of the pulmonary circulation**

---

## **The PulmoBind Safety Trial**

Principal Investigator

François Harel, MD  
Montreal Heart Institute  
5000 Belanger east  
Montreal, Quebec.  
H1T 1C8  
Phone: 514-376-3330 ext.3656  
Fax: 514-376-0936

Co-Investigator

Jocelyn Dupuis, MD. PhD  
Montreal Heart Institute  
5000 Belanger east  
Montreal, Quebec.  
H1T 1C8  
Phone: 514-376-3330 ext. 3542

This protocol contains information that is confidential and proprietary of  
The Montreal Heart Institute

**DATE OF PROTOCOL: Oct 24th 2011**

## PROTOCOL SIGNATURE PAGE

**PROTOCOL: The PulmoBind Safety Trial**

**VERSION 3 Oct24th 2011**

**PROTOCOL TITLE: Phase-I study of radiolabeled DFH-12 (PulmoBind) for molecular imaging of the pulmonary circulation**

**Investigator Name: Dr Francois Harel**

**Site Name / Address:** Montreal Heart Institute  
Nuclear Medicine Department  
5000 Belanger east  
Montreal, Quebec,  
H1T 1C8

---

As the Principal Investigator for the above referenced clinical study, I agree to adhere the guidelines set forth in the above referenced study protocol. This agreement will be in effect for the duration of the clinical trial.

---

Date

---

Investigator's signature

## TABLE OF CONTENTS

1. STUDY PROTOCOL	
1.1 Overall study design .....	218
1.2 Study population .....	218
1.3 Study Drug .....	218
1.4 Centers involved and duration of the study .....	219
1.5 Inclusion – Exclusion Criteria .....	219
1.6 Measurements .....	220
2. PROCEDURE	
2.1 Screening visit .....	223
2.2 Day 1 Setup .....	223
3. PEPTID PREPARATION AND LABELING	
3.1 Radio labeled – peptide and labeling .....	224
3.2 Blood Sampling .....	224
3.3 Nuclear medicine image acquisition .....	225
3.4 Urine and Stool collection .....	225
4. ADVERSE EXPERIENCE OR EVENTS	
4.1 Definitions .....	225
4.2 Timing for Reporting Serious Adverse Events .....	227
4.3 Reportable Events/Information .....	228
4.4 Unexpected Adverse Events .....	229
4.5 Adverse Events of Special Interest .....	229
4.6 Recording and Reporting .....	229
5. DATA QUALITY ASSURANCE .....	231
6. INVESTIGATOR’S REGULATORY OBLIGATIONS	
6.1 Case Report Forms .....	231
6.2 Adverse Event Reporting .....	231
6.3 Review of Source Records .....	231
6.4 Monitoring of the Study .....	232
6.5 Data Safety Committee .....	232
6.6 Protocol Amendments .....	232
6.7 Termination of the Study .....	233
6.8 Records Retention .....	233

7. ETHICS AND RADIO-SAFETY COMMITTEES	
7.1 Condition for withdrawal of patients from the study .....	234
8. STATISTICAL CONSIDERATION	
8.1 Sample size calculation.....	235
8.2 Data Analysis.....	236
8.3 Safety .....	236
8.4 Efficacy.....	236
9. DATA COORDINATION .....	237
APPENDIX 1 .....	238
APPENDIX 2 .....	239
APPENDIX 3 .....	242
APPENDIX 4.....	243
APPENDIX 5 .....	246
APPENDIX 6 .....	247
APPENDIX 7 .....	249

## **1. STUDY PROTOCOL**

### **1.1 Overall study design**

Single center, phase-I safety and efficacy study of a single intravenous injection of DFH-12 in normal adult human subjects.

### **1.2 Study Population**

Normal healthy subjects (n=20) will be recruited and serially included into three groups representing three increasing dosages of PulmoBind (5-10-15 mCi). To establish their healthy status, study participants will be evaluated by Research nurse of MHI research center and cardiologists associated to the study.

### **1.3 Study drug**

Group A, n=5: 5 mCi

Group B, n=5: 10 mCi

Group C, n=10: 15 mCi

These dosages are based on animal dosimetric studies extrapolated to humans (see appendix 7). No safety concerns have been observed for these dosages in animal studies. Radiolabeled PulmoBind is used in similar trace doses did not cause any detectable hemodynamic effects in animals. Since PulmoBind has never been evaluated in humans, the biodistribution may vary and the optimal dose needs to be determined. By comparison, the current dosage used for lung perfusion scanning with labeled albumin macro-aggregates is of up to 10 mCi.

### **Drug presentation –**

PulmoBind is supplied as a white lyophilized powder in sterile unidose vials containing 4.33 nmol of the compound. Labeling is performed by adding  $^{99m}\text{Tc}$  to the vial and purification of the radiolabeled PulmoBind is obtained by passing on SepPak cartridges with 50% ethanol. The final drug product contains 1.93 nmol of PulmoBind per 1ml of a 44% ethanol solution. The specific activity of the drug product is of 3.46 mCi/nmol for 15 mCi. The drug product is a clear colorless

solution. Administration is performed by mixing 5 mCi to 15 mCi of drug product with normal saline to a total of 10 ml and slowly intravenously injecting over 3 minutes using an automatic injector.

#### **1.4 Centers involved and duration of the study**

The study will be conducted in a single centre, at the nuclear medicine department and research center of the Montreal Heart Institute.

#### **1.5 Inclusion-Exclusion Criteria**

##### **Inclusion criteria**

- 1- Male and female subjects greater than 18 years of age. Female subjects must be post-menopausal (defined as two year after last menstrual cycle).
- 2- Baseline measurements must be in limit of normal for:
  - a. Blood pressure: systolic 100 mmHg to 140 mmHg, and diastolic 50 mmHg to 90 mmHg
  - b. Heart rate: 60 to 100 beats per minute
  - c. Oral temperature: less than 37.6°C
  - d. Respiratory rate: 12 to 20 breaths per minute
  - e. Lung function tests
  - f. Echocardiogram including estimation of pulmonary artery systolic pressure
  - g. Chest X-Ray
  - h. Electrocardiogram

##### **Exclusion criteria**

- 1- Any known chronic or acute medical condition with or without the need for chronic pharmacologic therapy or any condition that may interfere with normal biodistribution of DFH-12. This includes but is not restricted to: lung parenchymal or lung vascular diseases such as chronic obstructive pulmonary disease, bronchitis, lung cancer, pleural effusion, emphysema,

asthma, pulmonary fibrosis, occupational lung disease, pulmonary hypertension (primary or secondary), systemic hypertension, diabetes, cancer, kidney disease, liver disease, heart failure or previous myocardial infarction, coronary artery disease, peripheral vascular disease or inflammatory disease.

7. Subjects requiring chronic administration of any substance for a medical condition.
8. Active smoking or history of smoking for more than one year in the past 10 years.
9. Known self-reported alcoholism (active or abstinent). Subjects with possible alcohol dependence will complete the Michigan Alcohol Screening Test (MAST) and will be excluded if score is  $\geq 6$ .
10. Unable to tolerate study procedures (e.g. venipuncture, movement restrictions during imaging).
11. Previous nuclear study since one week (to avoid cross-contamination).

### **Concomitant medications**

All concomitant over the counter medications, including natural products and vitamins, will be stopped at least 48 hours prior to and for the duration of the study. Subjects requiring chronic administration of any substance for a medical condition will be excluded from participation in the study.

## **1.6 Measurements**

### **Baseline measurements (day -14 to day 0)**

- Informed consent form
- Review of inclusion/exclusion criteria
- Demographic data including race (for eGFR), gender, date of birth
- Medical history including risk factors (HTN, diabetes, dyslipemia, CAD, PVD, obesity, smoking)
- History of any medication intake
- Physical examination (including but not limited to abdomen, chest, heart, femoral and carotid pulses)
- Current medications

- Safety labs: Complete blood count, electrolytes, BUN, creatinine, calcium, phosphorus, magnesium, liver function tests (AST, ALT, Alc. Phos, total bilirubin, and LDH), CPK, total protein, albumin. PT, PTT, INR, urinary analysis, glucose, lipids (total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides)
- EKG
- Vital signs: Blood pressure, heart rate, respiratory rate, temperature and oxygen hemoglobin saturation.
- Lung function testing
- Chest X Ray
- Echocardiogram

At the time that all screening test were done, we will schedule the nuclear phase study that will be performed on two days. The patient will be informed to fast as from midnight, the day before nuclear study in medicine.

#### **Day 1: Study drug administration**

- Subject clinical stability review
- Vital signs: Blood pressure, heart rate, respiratory rate, temperature and oxygen hemoglobin saturation.
- EKG
- In-hospital urinary and feces collection
- Intravenous injection of <sup>99m</sup>Techetium-labeled DFH-12.
- Serial blood samples to determine DFH-12 plasma kinetic at 0 (pre-perfusion), 1min, 3 min (during perfusion), 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, (all times  $\pm$  10%).
- Serial vital signs (blood pressure, heart rate, respiratory rate, temperature, hemoglobin oxygen saturation) at same time points: 0 (pre-perfusion), 1min, 2 min, 3min (during perfusion), 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, (all times  $\pm$  10%).
- Image acquisition with dual head gamma camera to determine organs kinetic and distribution at 0, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, (all times  $\pm$  10%).



- Information to subject for urine collection (for 24 hours to determine radioactivity urinary excretion) and feces collection (for 48 hours to determine radioactivity fecal excretion).

**Day 2 : (27hours after drug administration)**

- Subject clinical stability review
- Vital signs: Blood pressure, heart rate, respiratory rate, temperature and oxygen hemoglobin saturation.
- Blood sample to determine DFH-12 plasma kinetic at 27h ( $\pm 10\%$ ).
- Lab tests: Complete blood count, electrolytes, BUN, creatinine, calcium, phosphorus, magnesium, liver function tests (AST, ALT, Alc. Phos, total bilirubin, and LDH), CPK, total protein, albumin. PT, PTT, INR.
- Study procedure in nuclear medicine: Image acquisition with dual head gamma camera to determine organs kinetic and distribution at, 27h ( $\pm 10\%$ ).
- Recovery of urinary and feces (in-home collections)
- EKG

**Day 3: (51 hours after drug administration)**

- Subject clinical stability review
- Vital signs: Blood pressure, heart rate, respiratory rate, temperature and oxygen hemoglobin saturation
- Lab tests: Complete blood count, electrolytes, BUN, creatinine, calcium, phosphorus, magnesium, liver function tests (AST, ALT, Alc. Phos, total bilirubin, and LDH), CPK, total protein, albumin. PT, PTT, INR.
- Recovery of feces in-home collections
- EKG
- Information to subject to report any adverse reaction that might be related to the DFH-12 administration

**Day 30: Phone call follow-up**

Subject clinical status review.

## **2.0 PROCEDURES**

### **2.1 Screening visit.**

A screening questionnaire will be administered to evaluate inclusion and exclusion criteria. If eligible, written informed consent will be obtained and the subject will have baseline safety labs, EKG, CXR, respiratory function tests and echocardiography scheduled as well as a physical examination by the study cardiologist. Those with normal screening evaluation will be included into the study.

### **2.2 Day 1 setup**

The study subject will be met by the registered nurse (RN). The nurse will evaluate the medical condition of the participant and assure that no new problem has appeared since the screening visit. She (he) will also verify that fasting was observed since midnight.. The study subject will be asked to try to spontaneously void its bladder and rectum if possible. As image acquisition will be performed continuously for the first two hours this will prevent the need to stop acquisition. Pre-study voiding will also decrease variability between subjects. Initial hydration will be performed orally with 200mL of water before the transmission scan.

Two intravenous catheters will be installed in both antecubital regions. The first catheter will be used to intravenous injection of the radiolabeled PulmoBind. The second catheter will be used for blood sampling. Two catheters are necessary in order to prevent radioactive cross-contamination. A physiological saline perfusion (NaCl 0.9%) will be installed allowing volume resuscitation should a blood pressure drop occur during the procedure.

The subject will comfortably lie down on the camera table, both arms beside his/her body. Cutaneous EKG leads and oxygen hemoglobin saturation probe will be installed. Subjects will be asked to minimize movements during image acquisition. A transmission scan will be acquired in a whole-body manner using a <sup>57</sup>Co flood source placed on the posterior detector of the camera. The anterior detector will then collect all surviving photons generating an attenuation map used in the

biodistribution and dosimetric calculations. Methodology and estimation of the dosimetry related to the transmission scan is included in appendix 2.

Vital signs (heart rate, blood pressure and oxygen hemoglobin saturation) will be taken via an automatic measurement device. Respiratory rate will be measure by counting thorax expansion during 30 seconds and by multiplying by 2. Temperature will be monitored by an oral electronic thermometer.

### **3. PEPTIDE PREPARATION AND LABELING**

#### **3.1 Radiolabeled-peptide injection**

The radiolabeled PulmoBind will be slowly injected intravenously over 3 minutes (automatic injector; Baxter Infusion Pump model AS40A) via the right forearm catheter by the nuclear technologist. A chronometer will be started at the beginning of injection, marking the  $t_0$  of the nuclear study and will be used as the reference time for all further calculations such as radionuclide decay correction. The subjects will be asked to spontaneously describe any sensation that he/she can feel during and after the PulmoBind injection. Comments will be written in the patient evolution notes by the research nurse.

#### **3.2 Blood sampling**

At the time of the injection, RN will start blood sampling via the arm catheter using 6mL standard vacuum sampling tube (BD Vacutainer) containing 10.8mg of EDTA. Serial blood samples will be performed at: 0, 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 27h (time variability allowed of  $\pm 10\%$ ). Blood samples will be stored in a refrigerator located in the nuclear research laboratory in addition to the morning blood sampling (10ml each morning). About 66mL of blood will be required for the whole analysis provided by 11 blood-samples of about 6mL each, taken at aforementioned times. Samples will then be counted using standard methodology provided in appendix 3.

### **3.3 Nuclear medicine image acquisition**

Scintigraphic images will be performed according to the nuclear images procedures included in appendix 4. Time will be allowed for lunch between the 2-hours and 4-hours images using a standardized meal to be taken in a quiet room within the nuclear medicine department. The subject will be supervised by the RN or technician at all times during the in-hospital observation. Hydration will be standardized and encouraged at up to 200mL of water orally every 60min starting 2 hours after the radiolabeled-peptide injection using the study-provided bottled water.

### **3.4 Urine and stool collection**

Starting at the beginning of radiolabeled PulmoBind injection, urine and feces will be collected separately in a non-sterile manner. For this procedure, pre-identified collecting containers will be provided. Subjects will be instructed to void bladder of rectum separately, allowing collection of sequential urinary mictions in a series of separate containers, and feces in another. The subjects will be instructed to correctly date and time each container. At the end of the nuclear study first day, RN will provide an icebox with ice packs and a series of pre-identified containers for in-home urinary/feces collection. These containers are designed for direct collection avoiding the need for transfer that could lead to loss of radioactivity. Radioactive measurement methodology for urinary and feces collections is provided in appendix 5.

## **4 ADVERSE EXPERIENCES OR EVENTS**

### **4.1 Definitions**

- An adverse experience or event is any untoward, undesired or unplanned event in the form of signs, symptoms, disease, or laboratory or physiological observations occurring in a person administered a clinical study. The event does not need to be causally related to the clinical study. An AE includes, but is not limited to any clinically significant worsening of a pre-existing condition.
- A procedure is not an AE, but the reason for a procedure may be an AE.
- A preexisting condition is a clinical condition (including a condition being treated) that is diagnosed before the subject signs the informed consent form and that is documented as part of the subject's medical history.

The questions concerning whether the condition existed before the start of the active phase of the study and whether it has increased in severity and/or frequency will be used to determine whether an event is a treatment-emergent AE (TEAE). An AE is considered to be treatment emergent if (1) it was not present when the active phase of the study began and is not a chronic condition that is part of the subject's medical history, or (2) it was present at the start of the active phase of the study or as part of the subject's medical history, but the severity or frequency increased during the active phase.

- The active phase of the study begins at the time of the first dose of the test article.
- A serious adverse event (SAE) is defined as an AE that:
  - Results in death
  - Is life-threatening (see below)
  - Requires inpatient hospitalization or prolongation of an existing hospitalization
  - Results in a persistent or significant disability or incapacity (see below)
  - Results in cancer
  - Results in a congenital anomaly or birth defect

Additionally, important medical events that may not result in death, be life-threatening, or require hospitalization may be considered SAEs when, based on appropriate medical judgment, they may jeopardize the subject and may require medical or surgical intervention to prevent one of the outcomes listed in this definition. Examples of such events include allergic bronchospasm requiring intensive treatment in an emergency room or at home, blood dyscrasias or convulsions that do not require hospitalization, or the development of drug dependency or abuse.

Life-threatening refers to immediate risk of death as the event occurred per the reporter. A life-threatening experience does not include an experience that, had it occurred in a more severe form, might have caused death but as it actually occurred did not create an immediate risk of death. For example, hepatitis that resolved without evidence of hepatic failure would not be considered life-threatening even though hepatitis of a more severe nature can be fatal. Similarly, an allergic

reaction resulting in angioedema of the face would not be life-threatening, even though angioedema of the larynx, allergic bronchospasm, or anaphylaxis can be fatal.

Hospitalization is to be considered only as an overnight admission. Hospitalization or prolongation of a hospitalization is a criterion for considering an AE to be serious. This is the case in the following situations:

- Hospitalization or prolongation of hospitalization is needed for a procedure required by the protocol. Day or night survey visits for biopsy or surgery required by the protocol is not considered serious.
- Hospitalization or prolongation of hospitalization is part of a routine procedure followed by the study center (e.g., stent removal after surgery). This should be recorded in the study file.
- Hospitalization for survey visits or annual physicals fall in the same category.
- In addition, a hospitalization planned before the start of the study for a preexisting condition that has not worsened does not constitute an SAE (e.g., elective hospitalization for a total knee replacement due to a preexisting condition of osteoarthritis of the knee that has not worsened during the study).
- 

Disability is defined as a substantial disruption in a person's ability to conduct normal life functions. If there is any doubt whether the information constitutes a SAE, the information is treated as a SAE.

#### **4.2 Timing for Reporting Serious Adverse Events**

Any SAE, regardless of causal relationship, must be reported to the Principal Investigator immediately. Compliance with this time requirement is essential so that the Principal Investigator may comply with regulatory obligations.

For all other inquiries and information about this study, contact Principal Investigator as listed in the front of this protocol.

### 4.3 Reportable Events/Information

- An AE or SAE can occur from the time that the subject signs the informed consent form to 30 days after the subject's last treatment dose regardless of protocol relationship. This includes events that emerge during the screening. All AEs and SAEs will be recorded on source documents and recorded on CRFs. All AEs and SAEs that occur after the screening period will be recorded on the CRFs. The Principal Investigator must follow up as medically necessary on all AEs, SAEs, and other reportable events until the event has subsided or values have returned to baseline, or in case of permanent impairment, until the condition stabilizes.
- The following events will be recorded and reported in the same time frame and following the same process as for SAEs:
  1. All pregnancies that occur during the study and their outcome. If a pregnancy is confirmed during the study, the continued use of the test article must be evaluated immediately. Administration of the test article should be discontinued unless the potential benefit to the subject justifies the potential risk to the fetus. The use of an approved drug may be continued if no evidence of teratogenic effects has been shown (e.g., in the package insert). When possible, all reports of pregnancy must be followed up for information about the course of the pregnancy and delivery, as well as the condition of the newborn. When the newborn is healthy, additional follow-up is not needed.
  2. Test article abuse (i.e., use for non clinical reasons) and overdose with or without an AE. An overdose is a dose higher than that prescribed by a healthcare professional for clinical reasons. It is up to the Principal Investigator to decide whether a dose was an overdose.

Post study test article-related SAEs.

- Abnormal biological or vital signs values that are considered clinically relevant by the Principal Investigator. These must be reported in the same time frame and following the same process as for an AE or an SAE.

#### **4.4 Unexpected Adverse Events**

An unexpected AE is one that is not listed in the product labeling. The current product labeling is the approved label.

An unexpected AE includes any event that may be symptomatically and pathophysiologically related to an event listed in the labeling, but differs from the labeled event because of greater severity or specificity. For example, hepatic necrosis is unexpected, by virtue of greater severity, if the product labeling referred only to elevated hepatic enzymes or hepatitis. Similarly, cerebral thromboembolism and cerebral vasculitis are unexpected, by virtue of greater specificity, if the labeling only listed cerebral vascular accident. An AE is considered unexpected for local reporting purposes if it does not appear in the approved labeling to which the AE is being reported.

#### **4.5 Adverse Events of Special Interest**

In addition, the following events termed adverse events of special interest, regardless of toxicity grade, should be reported as serious adverse events, even though not considered serious adverse events as per the definition in section 6.1. Adverse events of special interest include but are not limited to: serious infection, loss of consciousness, life threatening event, malignancy and death.

#### **4.6 Recording and Reporting**

At each required study visit, all AEs that have occurred since the previous visit must be recorded in the adverse event record of the subject's CRF. The information recorded should be based on the signs or symptoms detected during the physical examination and clinical evaluation of the subject. In addition to the information obtained from those sources, the subject should be asked the following nonspecific question: "How have you been feeling since your last visit?" Signs and symptoms should be recorded using standard medical terminology.

The following AE information must be included (when applicable): the specific condition or event and direction of change; whether the condition was preexisting (i.e., an acute condition present at the start of the study or history of a chronic condition) and, if so, whether it has worsened (e.g., in severity and/or frequency); the dates and times of occurrence; severity; causal relationship to test article; action taken; and outcome.



The causal relation between an AE and the test article will be determined by the investigator on the basis of his or her clinical judgment and the following definitions:

- Definitely related: Event can be fully attributable to administration of the test article.
- Probably related: Event is most likely to be explained by administration of the test article, rather than the subject's clinical state or other agents/therapies.
- Possibly related: Event is as likely explained by administration of the test article as, by the subject's clinical state or other agents/therapies.
- Probably not related: Event is most likely to be explained by the subject's clinical state or other agents/therapies, rather than the test article.
- Definitely not related: Event can be fully explained by the subject's clinical state or other agents/therapies, rather than the test article.

When assessing the relationship between administration of a test article and an AE, the following parameters are considered:

- Temporal relationship between administration of the test article/protocol and the AE
- Biological plausibility of relationship
- Subject's underlying clinical state or concomitant agents/therapies
- Where applicable, does the event abate on discontinuation of the test article (dechallenge)
- Where applicable, does the event reappear on repeat exposure to the test article (rechallenge)

SAEs that are not drug related may nevertheless be considered by the Principal Investigator to be related to the conduct of the clinical study, i.e., to a subject's participation in the study. For example, a protocol-related SAE may be an event that occurs during a washout period or that is related to a procedure required by the protocol.

## **5. DATA QUALITY ASSURANCE**

The Principal Investigator performs quality control and assurance checks on all clinical studies that he/she performs. Before enrolling any subjects in this study, the Principal Investigator and study coordinator review the protocol and the CRFs, determine the procedure for obtaining informed consent, and determine the procedure for reporting AEs and SAEs. The Principal Investigator or study coordinator reviews the data for accuracy and safety information. The Principal Investigator or study coordinator reviews the data for legibility, completeness, and logical consistency.

## **6. INVESTIGATOR'S REGULATORY OBLIGATIONS**

### **6.1 Case Report Forms**

All data will be recorded on CRFs provided by the MHICC. Black ballpoint pens should be used to complete the CRFs.

### **6.2 Adverse Event Reporting**

The Principal Investigator agrees to report all AEs as described in the Adverse Events section. If applicable, the Principal Investigator also is responsible for informing the participating IRB and Health Canada of any SAEs.

### **6.3 Review of Source Records**

The Principal Investigator agrees that regulatory agencies will have the right, both during and after this study, to conduct inspections and to audit and review medical records pertinent to the clinical study as permitted by the regulations. Subjects CRF's will not be identified by name, and confidentiality of information in medical records will be preserved. The confidentiality of the subject will be maintained unless disclosure is required by regulations. Accordingly, the following statement (or similar statement) will be included in the informed consent document: Representatives of regulatory agencies, and IRBs may review medical records and all information related to this study as permitted by law. Patient identifying information will not appear on any record received by the sponsor. The patient identity will remain confidential unless disclosure is required by law.

#### **6.4 Monitoring of the Study**

100% clinical monitoring of the CRFs will be provided by the Montreal Heart Institute Data Coordination center.

#### **6.5 Data safety committee**

An independent committee composed of an experienced cardiologist and nuclear medicine specialist will review all CRFs after each group of five subjects have been recruited. They will review the safety data and efficacy of PulmoBind for lung imaging for each group. They will make a written recommendation on the opportunity to continue the study. The committee may recommend to stop the study for safety concerns. The committee may also recommend to continue the study as planned. Finally, the committee may recommend to continue the study at a lower dosage than initially planned. The committee is to report to the sponsor (CQDM et ICM) and to the principal investigator. IRB committee will be informed of all data safety committee recommendation.

#### **6.6 Protocol Amendments**

Any significant change in the study protocol will require an amendment. The Principal Investigator must indicate his/her approval by signing the approval page of the amendment. The Principal Investigator submits it to the IRB for written approval. The approval letter, signed by the IRB chair, must refer specifically to the Principal Investigator, the protocol title, the protocol amendment number, and the date of the protocol amendment. The Principal Investigator submits a copy of the protocol amendment to the appropriate regulatory agency/agencies (if applicable). A protocol amendment may be implemented after it has been approved by the IRB. Where applicable, the amendment must receive a favorable opinion from the regulatory agency.

A protocol change intended to eliminate an apparent immediate hazard to subjects may be implemented immediately, but the change must then be documented in an amendment, reported to the IRB, and submitted to the appropriate regulatory agency in the required time frame.

## **6.7 Termination of the Study**

### Termination by the Principal Investigator

The Principal Investigator may terminate the study at any time for any of the following reasons:

1. Protocol violations.
2. Inaccurate or incomplete data.
3. Unsafe or unethical practices.
4. Suspected lack of efficacy.
5. Administrative decision.

If the Principal Investigator terminates the study prematurely, the Principal investigator will provide the IRB and appropriate regulatory agencies with a written statement describing why the study was terminated prematurely.

## **6.8 Records Retention**

The Principal Investigator shall retain and preserve one copy of all data generated in the course of the study, specifically including but not limited to those documents defined by GCP as essential documents, for 25 years.

## **7. ETHICS AND RADIO-SAFETY COMMITTEES**

Before study initiation of this protocol, the informed consent form as well as any advertisement for subject recruitment will be submitted for review and approval by the MHI Ethics Committee charged with this responsibility. The protocol will also be submitted to the radio-safety committee of the MHI that operates according to the guidelines of the Canadian Nuclear Safety Commission. The MHI Ethics Committee will submit written notification of that approval to the investigator. This study will be held according to the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice.

A Clinical Trial Application will be submitted to the Biologics and Therapeutic Directorate of Health Canada for a non-objection of the use of PulmoBind for this phase-I trial.

#### **7.1 Condition for withdrawal of patients from the study**

The patient will be free to withdraw from the study at any time without need to justify his/her decision. If the patient has already received the DFH-12 at the time of his/her decision, he will be requested to comply to a safety visit to assess his/her clinical status.

## 8. STATISTICAL CONSIDERATION

### 8.1. Sample Size Calculation

The primary safety concerns for PulmoBind are 1: Its dosimetric evaluation in human to determine the radiation dose to organs at risk and 2: Its potential hypotensive effects since this is this peptide's main effect at pharmacological dosage.

**1) Dosimetric evaluation.** The sample size of this safety study is primarily based on the dosimetric evaluation and biodistribution of PulmoBind in animal studies and extrapolated to humans using an accepted model (Appendix 7). We predict that a dose of 15 mCi will be safe and allow good quality lung imaging and that 10 subjects at this dosage will allow adequate dosimetric evaluation. Such a number of subjects is generally required for phase 1 radiopharmaceutical studies. As PulmoBind has never been injected to human subjects and the relative lung uptake of this tracer in man needs to be defined, three increasing doses will be administered and the subjects serially included into group A (5 mCi, n=5), group B (10 mCi, n=5) and group C (15 mCi, n=10). This will allow safety/efficacy evaluations for groups A and B and should allow the determination of the minimal effective dose of the agent. By comparison, the current dosage used for lung perfusion scanning with labeled albumin macro-aggregates is of up to 10 mCi. The highest dose of radioactivity to be studied (15 mCi, 18.5  $\mu$ g of PulmoBind) has not cause any significant acute hemodynamic effects in pre-clinical experiments with an established safety factor of 100X. In short term (21 days) repeated-dosing experiments in rats, no toxic effects were observed after administration of cumulative doses representing 900 times this amount.

**2) Hypotension.** The blood pressure measured in 1743 Canadian individuals of the WHO MONICA project [181] was  $121 \pm 16$  mmHg (mean  $\pm$  SD) for systolic and  $78 \pm 11$  for diastolic. Based on these values using a two-sided paired t test, a sample size of 20 (whole study group) will allow the detection of a reduction 12 mmHg of the systolic blood pressure (-10%) with a power of 0.90 and an alpha of 0.05. For a sample size of n=10 (group C, 15  $\mu$ Ci) the power to detect a reduction of 18 mmHg (-15%) with an alpha of 0.05 is 0.90. For a sample size of n=5 (groups A, 5  $\mu$ Ci; and group B, 10  $\mu$ Ci) the power to detect a reduction of 24 mmHg (-20%) with an alpha of 0.05 is 0.80.

Assuming a pre-post systolic blood pressure correlation of 0.5 detectable differences for the study groups are of 10.1% for n=20, 15.3% for n=10 and 22.2% for n=5.

## **8.2 Data Analysis**

Data analysis will be performed for the three study groups combined and for each group separately.

## **8.3 Safety**

All continuous safety parameters will be analyzed using paired t tests or repeated measures analysis of variance where appropriate. Due to too low power, adverse events and categorical safety parameters will be simply tabulated. Biodistribution and plasma kinetics will be determined for the three groups combined and comparisons between groups A, B and C performed by multiple groups ANOVA. The methods for biodistribution and dosimetric analysis are described in appendix 6. Plasma kinetics of PulmoBind will be determined using a two compartment model as previously done and described in details in animals with radiolabeled AM [170].

## **8.4 Efficacy**

The efficacy of PulmoBind to provide good quality of lung imaging will be determined by the principal investigator and another nuclear medicine specialist who will review each lung scan and grade them from I to IV. The apparent image quality will be judged by comparison the image quality currently obtained with radiolabeled albumin macroaggregates based on the investigator's judgment

- 1: Mediocre quality or not possible to use for anatomical imaging purposes
- 2: Less quality: could be used for imaging but with less quality in anatomical resolution
- 3: Equivalent quality:
- 4: Superior quality

## **9. DATA COORDINATION**

This study will be coordinated by the Montreal Heart Institute Coordination Center that will provide 100% clinical monitoring of the CRFs and be responsible for the data entry and statistical analysis.



## APPENDIX 1: Study flow chart

	Screening	Day 1	Day 2 (27 h)	Day 3 (51 h)	Day 30
Consent form	■				
Demographic data	■				
Physical examination (see appendix 2)	■				
Clinical status review		■	■	■	■ Phone call
Vital signs, weight, O <sub>2</sub> saturation	■ Height	■	■	■	
Urinary collection		■	■		
Feces collection		■	■	■	
Current medications	■	■	■	■	
Blood samples	■ Fasting	■ Fasting	■	■	
Urine analysis	■				
EKG	■	■	■	■	
Lung function testing	■				
Chest X ray	■				
Echocardiography	■				
Injection of <sup>99m</sup> Tc- labelled DFH-12		■			
Image acquisition		■ 6 times	■ 1 time		

## APPENDIX 2

### Methodology and dosimetry estimation for transmission scan

A transmission scan is performed in order to acquire an attenuation map of each subject. This map is used to compensate for the intrinsic attenuation created by the body, allowing accurate estimation of biodistribution.

#### 1. Methodologies for the transmission scan

The subject lies down on the camera table with the arms normally placed beside his/her body. We will ask to minimize his/her movements during the acquisition as the camera table slowly slides between each detector. The subjects won't feel any sensation during this part of study.

The e-cam dual-head camera (e.cam duet Signature dual head, Site no: 8259, MHI no: 1022942) will be used with the following parameters:

- Head configuration: 180°
- Up-position head active only
- <sup>57</sup>Cobalt flood source mounted on the other head detector, as far as possible from the patient
- Patient will be positioned as close as possible to the upper detector head
- Acquisition mode: whole-body, static, planar
- Matrix 256 x 1024 pixels
- Acquisition zoom: 1.0
- Auto-contour mode acquisition disabled
- Low energy high resolution collimators
- Table movements: 12 cm/minute
- Acquisition time: 18 minutes for a patient of 1.72m height

Radioisotope transmission source used

Perflexion source from Eckert & Ziegler company (flexible source)

Model: PF24R-057-20M

Isotope:  $^{57}\text{Co}$

Calibration: 20mCi on November, 1<sup>er</sup>, 2007

Source number: 1254-179.

**2. Methodologies for the transmission scan** (performed on E.Cam of the department of nuclear medicine July 11, 2008)

Because the camera has been used this day, there were no flood testing and no shutdown of any device before the procedure. Before starting, we execute a ‘‘home’’ positioning of the camera, to be sure that the position of the camera is always the same.

Contamination of the room wasn't verified before testing because there are patients on the camera right on the side of the E.Cam and also in the waiting room. To see if this changes the results, a background map have been processed in the same conditions as the one of the acquisition.

Camera parameters:

- Head configuration 180
- Only up-position head active
- Co57 flood source (PerflexionfromEckert&Ziegler (flexible source) model :PF24R-057-20M, 20mCi calibrated on November 1st, 2007 source number : 1254-179), mounted on the other head's detector, as far as possible of the patient. Because the source is flexible, it is put down on a ½ inch thick Plexiglas sheet.

- 11 inches have been calculated between the upper head and the table to calculate a space for the patient.
  - Low energy high resolution collimators
  - Acquisition mode: wholebody, static, planar
  - Matrix 256x1024 pixels
  - Acquisitions zoom: 1
  - Auto-contour mode acquisition disabled
  - Table movements: 12 cm/minute
  - Acquisition time: 16 minutes for a patient of 1.72m height.

For the whole time of the acquisition, the Victoreen counter (450B S/N 1960 no: 99040831) has been placed in the middle of the acquired surface of the table horizontally and vertically. It has been started in the mode that accumulates the counts exactly at the same time as the acquisition, and it has been stopped exactly at the same time as the acquisition did.

The result is: 5.3 $\mu$ Sv. The background result is: 0.0  $\mu$ Sv.

## APPENDIX 3

### **Blood sample radioactivity counting methodology**

All blood samples will be taken in a 6mL vacuum tube, by the RN. They will be identified with the subject's study ID number and the exact time of sampling in reference according to the time of radiolabeled PulmoBind injection ( $t_0$ ). They will be kept in the refrigerator of the nuclear lab during the day.

All the following steps will be performed by the nuclear medicine technologist. At the end of day 1, they will be gently mixed to make the sample homogeneous. Two samples of 2mL each will be taken with a graduated pipette and transferred into two different counting tubes for the Wallac counter (LKB Wallac 1272 Clinigamma with 2 x 2" detectors; S/N 720727), and previously identified the same way as the vacuum tubes were. Double counting setup will be used in order to verify reproducibility. The final result will be the mean of the two results except in the presence of blunt result.

They will be counted in the Wallac counter for 5 minutes each. The Wallac is accurate and express linear results for small activities (less than 10  $\mu$ Ci). Results are expressed in counts per minute. The counting stability of the counter is verified every day with a known  $^{57}\text{Co}$  calibrated source (no. 011396).

The samples will also be counted in the Capintec counter (CRC-15R, S/N 150179) of the nuclear medicine department (because it's the one used to calculate the dose we inject to the patient). The Capintec is more accurate for bigger activities (more than 10 $\mu$ Ci). The Capintec results are in Bq or Ci. We'll count sample in these two counters to confirm that the activity is accurate. The time of counting will be registered, according to the chronometer, for both counters. The same principle will be followed for the 27h blood sample. All samples will be kept in the Dr. Harel's laboratory refrigerator (MHI, local C-1490). They will be there as long as they are radioactive, then they will be thrown as biomedical waste.

## APPENDIX 4

### Scintigraphic images acquisition methodology

#### 1) Dynamic acquisition

A 30-minutes dynamic acquisition will be performed using a dual-head gamma camera from Siemens, model e-cam duet Signature (same camera as for transmission scan) with the following acquisition parameters:

- Acquisition mode: dynamic, planar
- Head configuration: 180°
- Matrix 256 x 256 pixels
- Low energy high resolution collimators
- Acquisition zoom: 1.0
- Image acquisition
  - Phase 1: 60 images at 1sec/image
  - Phase 2: 29 images at 1min/image.

#### 2) Whole-body acquisition

Serial whole-body images will be performed using the same gamma camera at 35min, 1h, 2h, 4h, 6h and 27h (all times  $\pm 10\%$ ) after radiolabeled-peptide injection. These whole-body emission scans will be performed simultaneously in anterior and posterior views. Following acquisition parameters will be used:

- Acquisition mode: whole-body, static, planar
- Head configuration: 180°
- Auto-contour mode acquisition enable
- Low energy high resolution collimators
- Matrix 256 x 1024 pixels
- Acquisition zoom: 1.0
- Table movements
  - 12 cm/minute for the first day nuclear study
  - 6cm/minute for the acquisition perform at 27 hours.

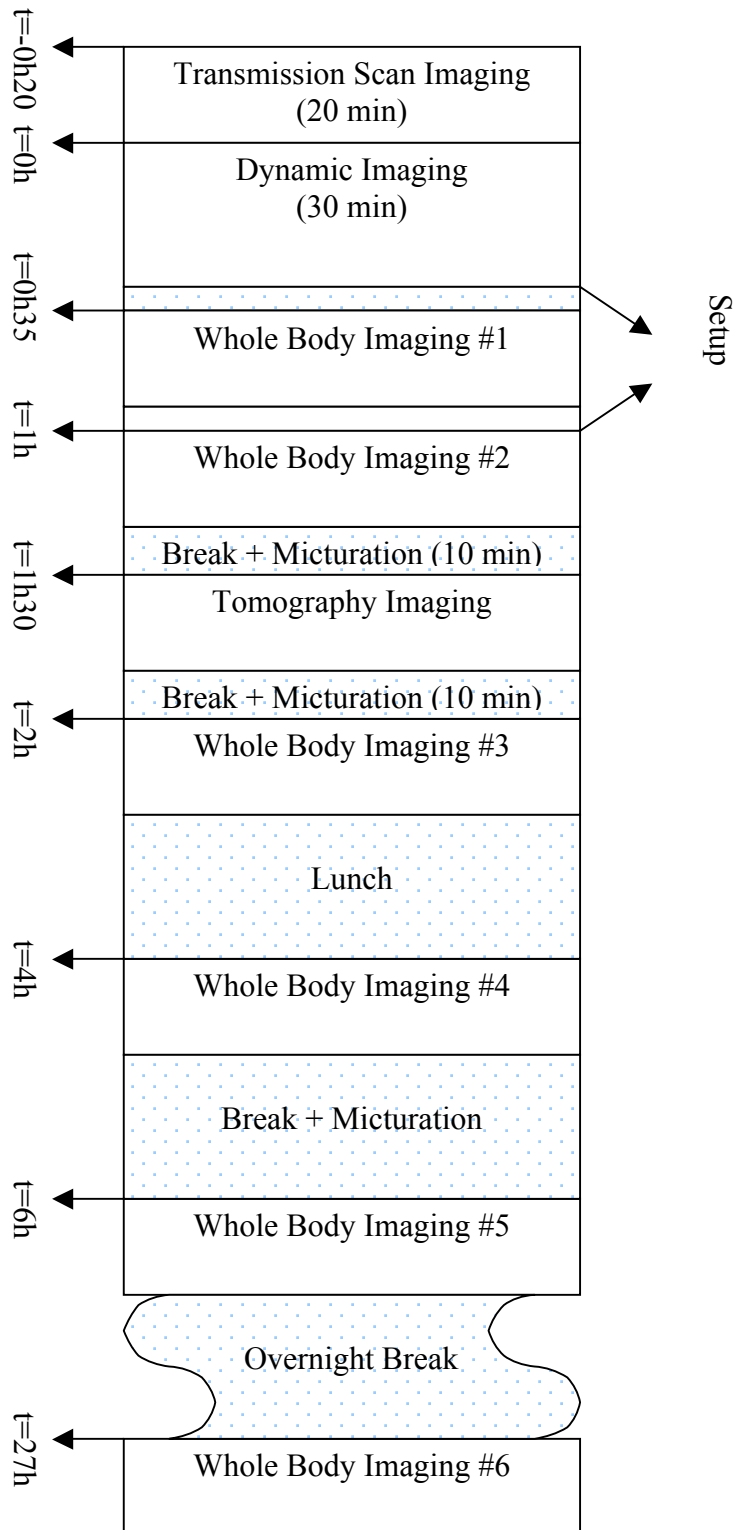
### 3) Tomographic acquisition

A tomographic acquisition will be performed centered on the lungs in order to evaluate the ability of DFH-12 to image lung perfusion. Following acquisition parameters will be used:

- Acquisition mode: static, non-gated tomography
- Head configuration: 180°
- Auto-contour mode acquisition enable (non-circularorbit)
- Step and shoot mode acquisition
- Low energy high resolution collimators
- Matrix 128 x 128 pixels
- Acquisition zoom: 1.0
- Head movements
  - 35 seconds per acquisition view
  - 64 projections over 360°
  - Calculated time duration estimated at 20 minutes

# First Day Nuclear Study

## Schematic of Temporal Procedure





## APPENDIX 5

### Radioactive measurement methodology for urinary and feces

#### 1) Urinary radioactivity measurements

For each collection container provided (different micturitions), a 2mL aliquot will be taken with a calibrated pipette after gently shaking the container. These aliquots will be pipetted into standard counting tubes. Each series of aliquots will be measured during 5 minutes with the gamma counter (LKB Wallac 1272 Clinigamma with 2 x 2" detectors; S/N 720727). Counts measurements will be further corrected for radioactive decay, according to the  $t_0$  time previously determined. Each micturition counting will be then expressed in percentage of injected dose (%ID). All samples will be measured at the end of the day of day 1 and day 2.

#### 2) Feces radioactivity measurements

Each stool collection container will be gently mixed in its respectively pot in order to obtain homogenous substance. Then, a 2mL sample will be taken from each container and counted, corrected for radioactive decay and expressed as %ID. Each stool sample will be measured at the end of day 1, day 2 and day 3.

## APPENDIX 6

### Biodistribution and dosimetry computation

#### 1) Biodistribution calculations

Regions of interest (ROI) are manually drawn over the most visible organs (lungs, heart, liver, kidneys and gallbladder). Background ROIs are drawn next to those organs.

For the fraction of injected dose (%ID) computation, all images are compensated for isotope half-life (6.01 hours for  $^{99m}\text{Tc}$ ). Background activities are removed from anterior and posterior activities of each organ by extrapolating on the size of the ROIs. Geometric means of anterior and posterior activities, and compensated for mean attenuation of that organ [212].

#### 2) Cumulated Dose

The cumulated dose ( ) is expressed in  $\text{Bq} \cdot \text{h} / \text{Bq}$ . The mean biodistribution curve of all subjects is estimated. These curves are fitted using a double exponential + plateau model. These fits are integrated to compute the of each organ.

Urine collection will be used to plot the cumulated %ID eliminated by the bladder. An exponential model will be used to fit the data and estimate 'halftime' and 'final uptake'. The fit will be integrated to give the urine . The fecal matter collection will be used to estimate total %ID and

. We can compute the 'remaining body activity' by subtracting the sum from theoretical total cumulated dose.

- $\text{Total} = t_{1/2} / \ln(2) = 8.67$  for  $^{99m}\text{Tc}$
- $\text{Remaining body activity} = \text{Total} - \Sigma$

### 3) Dosimetry computation

The dosimetry will be computed using OLINDA software (version 1.0)

'Halftime' and 'Final uptake' of the bladder will be estimated and used in OLINDA's *voiding bladder model* to 2h and 4.8h voiding intervals instead of using the computed previously.

The fecal matter total %ID will be used in OLINDA's *ICRP GI model* and specifying activities enter small intestine

Other are used "as is" in OLINDA (including the remaining body activity).

## APPENDIX 7

### Extrapolation of animal data to use in the internal dosimetry

#### 1) Introduction

In the pre-clinical development of PulmoBind, animal studies were performed to get a first approximation of the expected radiation dose absorbed in human subjects included. Despite the differences in the kinetic behavior between animal and human, an accepted extrapolation process was used to estimate human dosimetry.

#### 2) Choice of extrapolation methodology

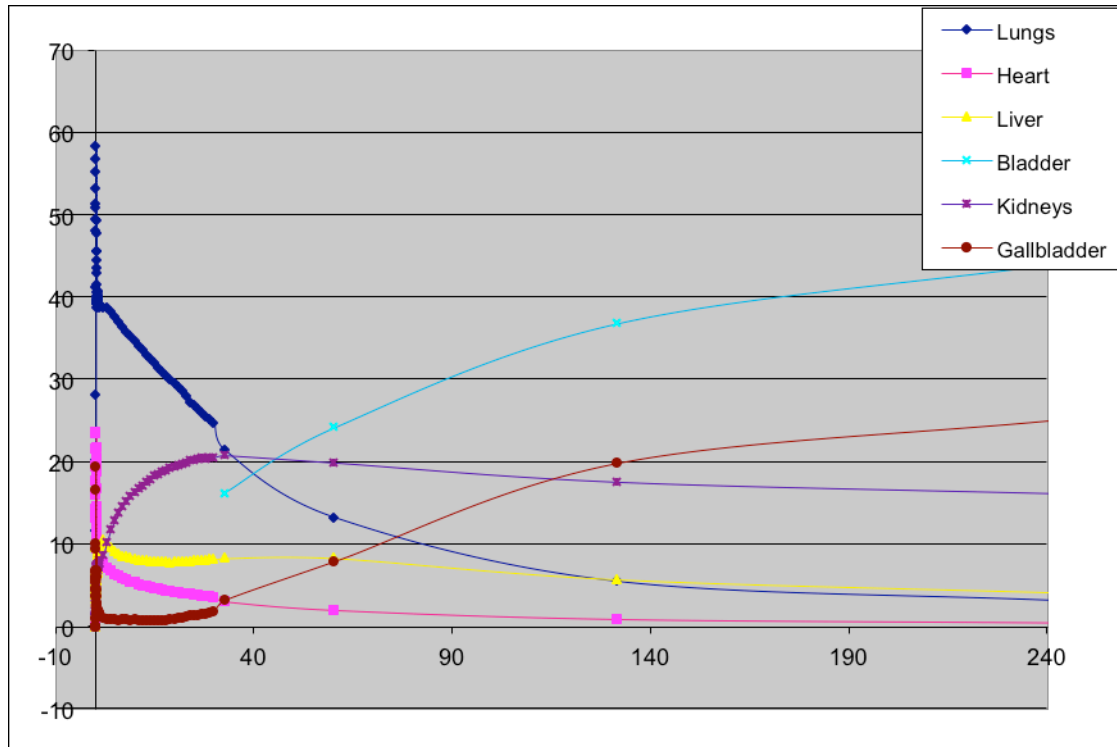
The dosimetric methodology that will be used in our trial is based on the techniques used during the pre-clinical phase. The radiation doses absorbed were computed using the biodistribution evaluation according to whole-body scintigraphic images. In this case, the relative weight of all animal organs were not known but estimated using the same proportion of a human model. So, for the extrapolation process, a relative '*organ mass scaling factor*' cannot be used. We rather use two other extrapolation processes named '*direct scaling factor*' and '*allometric scaling factor*'. The allometric scaling, is a time scaling approach that says physiological time for humans should be slowed down by a the forth root of the mass ratio:

$$t_{human} = t_{animal} \left( \frac{body\ mass_{human}}{body\ mass_{animal}} \right)^{1/4}$$

Scaling from a canine to a human model, this means that doubling the weight of the subject (35kg to 70kg) would mean scaling human physiology 1.19 slower than canine one.

#### 3) Pre-clinical dosimetry results

The product was injected to 7 dogs to estimate the mean biodistribution. We acquired a transmission wholebody, 30-minutes dynamic starting at  $t_0$  and wholebodies at 35 minutes, 1 hour, 2 hours and 4 hours. Regions of interest were drawn over visible organs and biodistribution was evaluated for those organs.



These curves were fitted using exponentials model and integrated to give cumulated dose ( ).

Allometric scaling was also applied (scaling human physiology 1.19 slower) and second set of was computed.

	Direct	Allometric
Lungs	0.52639	0.57594
Heart	0.088347	0.095303
Liver	0.30258	0.33493
Bladder*	0.4659/1.1883	0.4424/1.1247
Kidneys	1.5959	1.594
Gallbladder	2.3102	2.2004

\* Computed in OLINDA with 2h/4.8 hour voiding

#### 4) Human estimation of radiation absorbed dose

Dose (photon) (mGy/5mCi)		
Organ	Direct	Allometric
Kidneys	6.35	6.33
Liver	2.16	2.16
Lungs	0.81	0.85
Spleen	1.20	1.20
Total Body	0.63	0.63
Bladder Wall		
2h void	1.96	1.87
4.8h void	4.51	4.29
Testes		
2h void	0.30	0.30
4.8h void	0.48	0.47
Ovaries		
2h void	0.91	0.90
4.8h void	1.24	1.21

Total effective (mSv/5mCi)	Direct	Allometric
male 2h void	1.39	1.39
4.8h void	1.75	1.74
female 2h void	1.73	1.74
4.8h void	2.24	2.22

# Références

# Références

1. Levitzky MG: **Pulmonary Physiology**, 8 edition edn: McGraw-Hill Education; 2013.
2. red A. Mettler J, MD, MPH, Milton J. Guiberteau, MD **Essentials of Nuclear Medicine Imaging**, 6th edn: Saunders; 2005.
3. Marieb EN: **Human Anatomy & Physiology**: Pearson; 2015.
4. J.Deepak RP, H. Krovvidi **Non respiratory functions of the lung**. *Continuing education in anesthesia, critical care and pain* 2013:1.
5. West JB: **RESPIRATORY PHYSIOLOGY: THE ESSENTIALS**, Ninth edition edn: LWW; 2011.
6. Wanger J: **Pulmonary Function Testing: A Practical Approach**, 3 edition edn: Jones & Bartlett Learning; 2011.
7. **Spirometry**
8. Baile EM: **The anatomy and physiology of the bronchial circulation**. *J Aerosol Med* 1996, **9**(1):1-6.
9. Huang W, Yen RT, McLaurine M, Bledsoe G: **Morphometry of the human pulmonary vasculature**. *J Appl Physiol (1985)* 1996, **81**(5):2123-2133.
10. Townsley MI: **Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins**. *Compr Physiol* 2012, **2**(1):675-709.
11. Hagner S, Haberberger R, Hay DL, Facer P, Reiners K, Voigt K, McGregor GP: **Immunohistochemical detection of the calcitonin receptor-like receptor protein in the microvasculature of rat endothelium**. *Eur J Pharmacol* 2003, **481**(2-3):147-151.
12. Glenny RW, Robertson HT: **Fractal properties of pulmonary blood flow: characterization of spatial heterogeneity**. *J Appl Physiol (1985)* 1990, **69**(2):532-545.
13. Comolet R: **Mécanique expérimentale des fluides - Volume 1 - Statique et dynamique des fluides non visqueux**, (5e édition) edn: Sciences sup; 2002.
14. AUBIER MICHEL CB, FOURNIER Michel et MAL Hervé: **Traité de pneumologie** 2e édition edn; 2009.
15. Watanabe H, Ohashi K, Takeuchi K, Yamashita K, Yokoyama T, Tran QK, Satoh H, Terada H, Ohashi H, Hayashi H: **Sildenafil for primary and secondary pulmonary hypertension**. *Clin Pharmacol Ther* 2002, **71**(5):398-402.
16. Jardins TD: **Cardiopulmonary Anatomy & Physiology: Essentials of Respiratory Care**: Nelson Education; 2012.



17. Hopkins SR, Henderson, A. C., Levin DL, Yamada K, Arai T, Buxton RB, Prisk GK: **Vertical gradients in regional lung density and perfusion in the supine human lung: the Slinky effect.** *J Appl Physiol (1985)* 2007, **103**(1):240-248.
18. West JB, Dollery CT, Naimark A: **Distribution of Blood Flow in Isolated Lung; Relation to Vascular and Alveolar Pressures.** *J Appl Physiol* 1964, **19**:713-724.
19. JB W: **Ventilation/Blood flow and gas exchange**, ed 4 edn: Oxford; 1970.
20. Lumb AB: **Applied respiratory physiology**, 7 edition edn: Churchill Livingstone; 2000.
21. Ceylan E, Comlekci A, Akkoclu A, Ceylan C, Itil O, Ergor G, Yesil S: **The effects of body fat distribution on pulmonary function tests in the overweight and obese.** *South Med J* 2009, **102**(1):30-35.
22. Rao DP, Rao VA: **Morbidly obese parturient: Challenges for the anaesthesiologist, including managing the difficult airway in obstetrics. What is new?** *Indian J Anaesth* 2010, **54**(6):508-521.
23. H. Guénard SR: **Aspects physiologiques du vieillissement respiratoire.** *Revue des Maladies Respiratoires* 2002, **19**(2): 230-240.
24. Dockery DW, Ware JH, Ferris BG, Jr., Glicksberg DS, Fay ME, Spiro A, 3rd, Speizer FE: **Distribution of forced expiratory volume in one second and forced vital capacity in healthy, white, adult never-smokers in six U.S. cities.** *Am Rev Respir Dis* 1985, **131**(4):511-520.
25. Knudson RJ, Slatin RC, Lebowitz MD, Burrows B: **The maximal expiratory flow-volume curve. Normal standards, variability, and effects of age.** *Am Rev Respir Dis* 1976, **113**(5):587-600.
26. Enright PL, Kronmal RA, Higgins M, Schenker M, Haponik EF: **Spirometry reference values for women and men 65 to 85 years of age. Cardiovascular health study.** *Am Rev Respir Dis* 1993, **147**(1):125-133.
27. Hankinson JL, Odencrantz JR, Fedan KB: **Spirometric reference values from a sample of the general U.S. population.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**(1):179-187.
28. Mandelbrot B: **How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension.** *Science* 1967, **156**(3775):636-638.
29. Glenny RW: **Determinants of regional ventilation and blood flow in the lung.** *Intensive Care Med* 2009, **35**(11):1833-1842.
30. Glenny RW, Bernard SL, Luchtel DL, Neradilek B, Polissar NL: **The spatial-temporal redistribution of pulmonary blood flow with postnatal growth.** *J Appl Physiol (1985)* 2007, **102**(3):1281-1288.

31. Glenny RW, McKinney S, Robertson HT: **Spatial pattern of pulmonary blood flow distribution is stable over days.** *J Appl Physiol (1985)* 1997, **82**(3):902-907.
32. Galvin I, Drummond GB, Nirmalan M: **Distribution of blood flow and ventilation in the lung: gravity is not the only factor.** *Br J Anaesth* 2007, **98**(4):420-428.
33. Fishman AP: **Acute hypoxia and pulmonary vasoconstriction in humans: uncovering the mechanism of the pressor response.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**(5):L893-894.
34. Jolin A, Kjaeve J, Hambraeus K, Sollevi A, Bindslev L, Bjertnaes LJ: **The influence of adenosine on hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction in isolated perfused rat lungs.** *J Cardiothorac Anesth* 1989, **3**(5 Suppl 1):33.
35. Stevens T: **Functional and molecular heterogeneity of pulmonary endothelial cells.** *Proc Am Thorac Soc* 2011, **8**(6):453-457.
36. Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM: **Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx.** *Circ Res* 1999, **84**(2):210-219.
37. Mark Kester KDK, Kent E. Vrana: **Elsevier's Integrated Review Pharmacology**, ed. 2 edn.
38. Laurence Brunton JL, Keith Parker: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, ed. 11 edn: McGraw-Hill Medical; 2005.
39. Nagao T, Fujishima M, Vanhoutte PM: **Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery.** *Jpn J Pharmacol* 1992, **58** Suppl 2:342P.
40. Spector AA: **Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway.** *J Lipid Res* 2009, **50** Suppl:S52-56.
41. Straub AC, Zeigler AC, Isakson BE: **The myoendothelial junction: connections that deliver the message.** *Physiology (Bethesda)* 2014, **29**(4):242-249.
42. Dupuis J, Harel F, Nguyen QT: **Molecular imaging of the pulmonary circulation in health and disease.** *Clin Transl Imaging* 2014, **2**(5):415-426.
43. Barst RJ: **Pulmonary hypertension: past, present and future.** *Ann Thorac Med* 2008, **3**(1):1-4.
44. Andrei Seferian GS: **Hypertension pulmonaire: définition, diagnostic et nouvelle classification.** *Press Med* 2014, **43**:935.
45. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S: **An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2007, **30**(1):104-109.

46. **Hypertension arterielle pulmonaire**
47. B. Sztrymf DM, G. Simoneau, M. Humbert: **Prise en charge diagnostique et thérapeutique de l'hypertension artérielle pulmonaire.** *Réanimation Elsevier Masson SAS* 2007, **16**:294-301.
48. Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, Frantz RP, Foreman AJ, Coffey CS, Frost A, Barst RJ, Badesch DB, Elliott CG *et al*: **Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL).** *Circulation* 2010, **122**(2):164-172.
49. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM: **Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension.** *Circulation* 2004, **109**(2):159-165.
50. Voelkel NF: **Pulmonary hypertension : the present and future.** Shelton, Conn.: People's Medical Pub. House-USA; 2011.
51. Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoepfer MM, Gottlieb J, Nickel N, Hussein K, Maus U, Lehmann U *et al*: **Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment.** *The American journal of pathology* 2011, **179**(1):167-179.
52. Vaillancourt M, Ruffenach G, Meloche J, Bonnet S: **Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension.** *Can J Cardiol* 2015, **31**(4):407-415.
53. A. Chaouat MH: **Remodelage vasculaire pulmonaire.** *La lettre du Pneumologue* 2003, **6**(1).
54. Raja SG, Raja SM: **Treating pulmonary arterial hypertension: current treatments and future prospects.** *Thorax* 2011, **66**(6):359-370.
55. Rabinovitch M: **Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.** *J Clin Invest* 2012, **122**(12):4306-4313.
56. Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, Berger RM: **The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013, **305**(1):L1-14.
57. Wagenvoort CA MW: **Biopsy Pathology of the Pulmonary Vasculature** London, UK: Chapman and Hall Medical; 1989.
58. Dupuis J WN: **Animals models of pulmonary hypertension:** Springer Science; 2011.
59. Kay JM, Harris P, Heath D: **Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds.** *Thorax* 1967, **22**(2):176-179.
60. Dupuis J, Harel F, Fu Y, Nguyen QT, Letourneau M, Prefontaine A, Fournier A: **Molecular imaging of monocrotaline-induced pulmonary vascular disease with radiolabeled linear adrenomedullin.** *J Nucl Med* 2009, **50**(7):1110-1115.

61. Letourneau M, Nguyen QT, Harel F, Fournier A, Dupuis J: **PulmoBind, an adrenomedullin-based molecular lung imaging tool.** *J Nucl Med* 2013, **54**(10):1789-1796.
62. Fu Y, Letourneau M, Nguyen QT, Chatenet D, Dupuis J, Fournier A: **Characterization of the adrenomedullin receptor acting as the target of a new radiopharmaceutical biomolecule for lung imaging.** *Eur J Pharmacol* 2009, **617**(1-3):118-123.
63. Nassiba Merabet QTN, Sophie Marcil, Bernard Meloche, Yan Fen Shi, Jean-Claude Tardif, François Harel and Jocelyn Dupuis: **Molecular Spect Imaging of Early Angioproliferative Group I Pulmonary Arterial Hypertension Using an Adrenomedullin Receptor Ligand.** *Circulation* November 25, 2014 **Volume 130, Issue Suppl 2**
64. Arcasoy SM, Christie JD, Ferrari VA, Sutton MS, Zisman DA, Blumenthal NP, Pochettino A, Kotloff RM: **Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in patients with advanced lung disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**(5):735-740.
65. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS *et al*: **Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).** *Eur Heart J* 2009, **30**(20):2493-2537.
66. Ariel Cohen PG: **Manuel d'échocardiographie clinique:** Lavoisier; 2012.
67. Greiner S, Jud A, Aurich M, Hess A, Hilbel T, Hardt S, Katus HA, Mereles D: **Reliability of noninvasive assessment of systolic pulmonary artery pressure by Doppler echocardiography compared to right heart catheterization: analysis in a large patient population.** *J Am Heart Assoc* 2014, **3**(4).
68. Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T, Champion HC, Girgis RE, Corretti MC, Hassoun PM: **Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **179**(7):615-621.
69. Rich JD, Shah SJ, Swamy RS, Kamp A, Rich S: **Inaccuracy of Doppler echocardiographic estimates of pulmonary artery pressures in patients with pulmonary hypertension: implications for clinical practice.** *Chest* 2011, **139**(5):988-993.
70. D'Alto M, Romeo E, Argiento P, D'Andrea A, Vanderpool R, Correra A, Bossone E, Sarubbi B, Calabro R, Russo MG *et al*: **Accuracy and precision of**

- echocardiography versus right heart catheterization for the assessment of pulmonary hypertension.** *Int J Cardiol* 2013, **168**(4):4058-4062.
71. Zhang RF, Zhou L, Ma GF, Shao FC, Wu XH, Ying KJ: **Diagnostic value of transthoracic Doppler echocardiography in pulmonary hypertension: a meta-analysis.** *Am J Hypertens* 2010, **23**(12):1261-1264.
  72. Janda S, Shahidi N, Gin K, Swiston J: **Diagnostic accuracy of echocardiography for pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis.** *Heart* 2011, **97**(8):612-622.
  73. Taleb M, Khuder S, Tinkel J, Khouri SJ: **The diagnostic accuracy of Doppler echocardiography in assessment of pulmonary artery systolic pressure: a meta-analysis.** *Echocardiography* 2013, **30**(3):258-265.
  74. Maron BA, Bhatt DL, Nykiel M, Kinlay S, Waxman AB: **Protocol for vasoreactivity testing with epoprostenol in pulmonary hypertension.** *Crit Pathw Cardiol* 2012, **11**(1):40-42.
  75. Sharma A, Obiagwu C, Mezue K, Garg A, Mukherjee D, Haythe J, Shetty V, Einstein AJ: **Role of Vasodilator Testing in Pulmonary Hypertension.** *Prog Cardiovasc Dis* 2016, **58**(4):425-433.
  76. Antoine Pasche J-WF: **Interprétation des explorations fonctionnelles respiratoires.** *Forum Med Suisse* 2012, **12**(26):525.
  77. A. Chaouat MC, J.-P. Kraemer, I. Enache, A. Ducoloné, R. Kessler, E. Weitzenblum: **Explorations fonctionnelles dans l'hypertension artérielle pulmonaire.** *Revue des Maladies Respiratoires* 2005, **22**(6):991.
  78. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CP, Gustafsson P, Hankinson J *et al*: **Interpretative strategies for lung function tests.** *Eur Respir J* 2005, **26**(5):948-968.
  79. R. Hyatt PS, M. Nakamura: **Intepretation of pulmonary function test: A patical guide.** *Lippincott William and Wilkins* 2009:130.
  80. Provencher S. Martel S: **L'hypertension pulmonaire: votre patient peut-il être traité?** *Le clinicien* novembre 2004:81.
  81. **Imagerie médicale**
  82. Henry N. Wagner Jr. MD P: **A Personal History of Nuclear Medicine.** *Springer London* 2006.
  83. Leblanc M, Paul N: **V/Q SPECT and computed tomographic pulmonary angiography.** *Semin Nucl Med* 2010, **40**(6):426-441.
  84. Anderson DR, Barnes DC: **Computerized tomographic pulmonary angiography versus ventilation perfusion lung scanning for the diagnosis of pulmonary embolism.** *Curr Opin Pulm Med* 2009, **15**(5):425-429.

85. Fan L, Liu SY, Xiao XS, Sun F: **Demonstration of pulmonary perfusion heterogeneity induced by gravity and lung inflation using arterial spin labeling.** *Eur J Radiol* 2010, **73**(2):249-254.
86. Zadehkoochak M, Blott BH, Hames TK, George RF: **Pulmonary perfusion and ventricular ejection imaging by frequency domain filtering of EIT (electrical impedance tomography) images.** *Clin Phys Physiol Meas* 1992, **13 Suppl A**:191-196.
87. Nguyen DT, Jin C, Thiagalingam A, McEwan AL: **A review on electrical impedance tomography for pulmonary perfusion imaging.** *Physiol Meas* 2012, **33**(5):695-706.
88. D. Visvikis \* FL, P. Bruyant, A. Turzo, Y. Bizais, C. Cheze Le Rest: **Correction de mouvement respiratoire en TEP/TDM.** *Médecine Nucléaire* (2007), **31**:153–159.
89. Khalil MM: **Basic Sciences of Nuclear Medicine:** Springer eBooks; 2011.
90. Anger HO, Upham FT: **In vivo counting methods in medical research.** *Methods Med Res* 1960, **8**:249-253.
91. Mathias CJ, Green MA: **A convenient route to [68Ga]Ga-MAA for use as a particulate PET perfusion tracer.** *Appl Radiat Isot* 2008, **66**(12):1910-1912.
92. Rossin R, Muro S, Welch MJ, Muzykantov VR, Schuster DP: **In vivo imaging of 64Cu-labeled polymer nanoparticles targeted to the lung endothelium.** *J Nucl Med* 2008, **49**(1):103-111.
93. Lebtahi R, Moreau S, Marchand-Adam S, Debray MP, Brauner M, Soler P, Marchal J, Raguin O, Gruaz-Guyon A, Reubi JC *et al*: **Increased uptake of 111In-octreotide in idiopathic pulmonary fibrosis.** *J Nucl Med* 2006, **47**(8):1281-1287.
94. Vallabhajosula S, Moyer BR, Lister-James J, McBride BJ, Lipszyc H, Lee H, Bastidas D, Dean RT: **Preclinical evaluation of technetium-99m-labeled somatostatin receptor-binding peptides.** *J Nucl Med* 1996, **37**(6):1016-1022.
95. Arao T, Takabatake N, Sata M, Abe S, Shibata Y, Honma T, Takahashi K, Okada A, Takeishi Y, Kubota I: **In vivo evidence of endothelial injury in chronic obstructive pulmonary disease by lung scintigraphic assessment of (123)I-metaiodobenzylguanidine.** *J Nucl Med* 2003, **44**(11):1747-1754.
96. Hagan G, Southwood M, Treacy C, Ross RM, Soon E, Coulson J, Sheares K, Sreaton N, Pepke-Zaba J, Morrell NW *et al*: **(18)FDG PET imaging can quantify increased cellular metabolism in pulmonary arterial hypertension: A proof-of-principle study.** *Pulm Circ* 2011, **1**(4):448-455.
97. Hopkins SR, Wielputz MO, Kauczor HU: **Imaging lung perfusion.** *J Appl Physiol (1985)* 2012, **113**(2):328-339.

98. Gupta TK: **Radiation, Ionization, and Detection in Nuclear Medicine**: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
99. Augusto Giussani CH: **Imaging in Nuclear Medicine**: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
100. Saha GB: **Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine**, 4th ed. edn: Springer New York; 2013.
101. Joseph Magill JG: **Radioactivity Radionuclides Radiation**: Springer Science & Business Media; 2005.
102. Michel Comet MV: **Radiopharmaceutiques : chimie des radiotraceurs et applications biologiques**: PUG; 1999.
103. Sime RL: **Lise Meitner: A Life in Physics**; 1996.
104. Whipple C: **Medical Isotope Production Without Highly Enriched Uranium**: The National Academies Press, <http://www.nap.edu/read/12569/chapter/4>; 2009.
105. Van Audenhaege K, Van Holen R, Vandenberghe S, Vanhove C, Metzler SD, Moore SC: **Review of SPECT collimator selection, optimization, and fabrication for clinical and preclinical imaging**. *Med Phys* 2015, **42**(8):4796-4813.
106. Soret M, Bacharach SL, Buvat I: **Partial-volume effect in PET tumor imaging**. *J Nucl Med* 2007, **48**(6):932-945.
107. SantéCanada: **Radiation Protection Regulations (SOR/2000-203)**. In.; 2015.
108. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Radioactivite-dosesDHE.jpg>
109. Hino-Shishikura A, Suzuki A, Minamimoto R, Shizukuishi K, Oka T, Tateishi U, Sugae S, Ichikawa Y, Horiuchi C, Inoue T: **Biodistribution and radiation dosimetry of [(1)(8)F]-5-fluorouracil**. *Appl Radiat Isot* 2013, **75**:11-17.
110. **Radiation weighting factors selon Euratum basic standard**
111. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T: **Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma**. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **192**(2):553-560.
112. Beltowski J, Jamroz A: **Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery?** *Pol J Pharmacol* 2004, **56**(1):5-27.
113. Di Paola R, Talero E, Galuppo M, Mazzon E, Bramanti P, Motilva V, Cuzzocrea S: **Adrenomedullin in inflammatory process associated with experimental pulmonary fibrosis**. *Respir Res* 2011, **12**:41.
114. Sim RB, Ferluga J, Al-Rashidi H, Abbow H, Schwaeble W, Kishore U: **Complement factor H in its alternative identity as adrenomedullin-binding protein 1**. *Mol Immunol* 2015, **68**(1):45-48.
115. Nishikimi T: **Adrenomedullin in Cardiovascular Disease**. United States: Spinger; 2005.

116. Nascimento RA, Mendes G, Possomato-Vieira JS, Goncalves-Rizzi VH, Kushima H, Delella FK, Dias-Junior CA: **Metalloproteinase Inhibition Protects against Reductions in Circulating Adrenomedullin during Lead-induced Acute Hypertension.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015, **116**(6):508-515.
117. Hinson JP, Kapas S, Smith DM: **Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide.** *Endocr Rev* 2000, **21**(2):138-167.
118. Y.-E. Claessens ET: **Le mid regional proadrenomedullin (MRproADM).** *Les biomarqueurs en médecine d'urgence* 2012, Springer-Verlag.
119. Nilsson UR, Muller-Eberhard HJ: **Studies on the mode of action of the fifth, sixth and seventh component of human complement in immune haemolysis.** *Immunology* 1967, **13**(1):101-117.
120. Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, Kowalak JA, Bengoechea JA, Zipfel PF, Elsasser TH, Cuttitta F: **Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners.** *J Biol Chem* 2001, **276**(15):12292-12300.
121. Pio R, Elsasser TH, Martinez A, Cuttitta F: **Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma.** *Microsc Res Tech* 2002, **57**(1):23-27.
122. Cheung BM, Tang F: **Adrenomedullin: exciting new horizons.** *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012, **6**(1):4-17.
123. Kato J, Kitamura K: **Bench-to-bedside pharmacology of adrenomedullin.** *Eur J Pharmacol* 2015, **764**:140-148.
124. Paulmyer-Lacroix O, Desbriere R, Poggi M, Achard V, Alessi MC, Boudouresque F, Ouafik L, Vuaroqueaux V, Labuhn M, Dutourand A *et al*: **Expression of adrenomedullin in adipose tissue of lean and obese women.** *Eur J Endocrinol* 2006, **155**(1):177-185.
125. Isumi Y, Minamino N, Katafuchi T, Yoshioka M, Tsuji T, Kangawa K, Matsuo H: **Adrenomedullin production in fibroblasts: its possible function as a growth regulator of Swiss 3T3 cells.** *Endocrinology* 1998, **139**(5):2552-2563.
126. Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, Sasano H, Shirato K, Shibahara S: **Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis.** *Clin Sci (Lond)* 1999, **97**(2):247-251.
127. Kawano S, Kawagoe Y, Kuwasako K, Shimamoto S, Igarashi K, Tokashiki M, Kitamura K, Kato J: **Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain.** *Endocr Connect* 2015, **4**(1):43-49.
128. Yoshibayashi M, Kamiya T, Kitamura K, Saito Y, Kangawa K, Nishikimi T, Matsuoka H, Eto T, Matsuo H: **Plasma levels of adrenomedullin in primary**



- and secondary pulmonary hypertension in patients <20 years of age.** *Am J Cardiol* 1997, **79**(11):1556-1558.
129. Gomez AP, Moreno MJ, Iglesias A, Coral PX, Hernandez A: **Endothelin 1, its endothelin type A receptor, connective tissue growth factor, platelet-derived growth factor, and adrenomedullin expression in lungs of pulmonary hypertensive and nonhypertensive chickens.** *Poult Sci* 2007, **86**(5):909-916.
  130. Gottsater M, Ford LB, Ostling G, Persson M, Nilsson PM, Melander O: **Adrenomedullin is a marker of carotid plaques and intima-media thickness as well as brachial pulse pressure.** *J Hypertens* 2013, **31**(10):1959-1965.
  131. Wong HK, Cheung TT, Cheung BM: **Adrenomedullin and cardiovascular diseases.** *JRSM Cardiovasc Dis* 2012, **1**(5).
  132. Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Yanai M, Sasaki H, Shirato K, Shibahara S: **Production and secretion of adrenomedullin in cultured human alveolar macrophages.** *Peptides* 1999, **20**(9):1123-1125.
  133. Cormier-Regard S, Nguyen SV, Claycomb WC: **Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes.** *J Biol Chem* 1998, **273**(28):17787-17792.
  134. Ishimitsu T, Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, Matsuoka H: **Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure.** *J Clin Invest* 1994, **94**(5):2158-2161.
  135. Ogita T, Hashimoto E, Yamasaki M, Nakaoka T, Matsuoka R, Kira Y, Fujita T: **Hypoxic induction of adrenomedullin in cultured human umbilical vein endothelial cells.** *J Hypertens* 2001, **19**(3 Pt 2):603-608.
  136. Parlapiano C, Paoletti V, Campana E, Labbadia G, Giovanniello T, Califano F, Pantone P, Clemente G, Donnarumma L, Musca A: **Adrenomedullin assay and its clinical significance.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 1999, **3**(2):53-61.
  137. Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Matsuo H: **Effects of vasoactive substances and cAMP related compounds on adrenomedullin production in cultured vascular smooth muscle cells.** *FEBS Lett* 1995, **369**(2-3):311-314.
  138. Hofbauer KH, Schoof E, Kurtz A, Sandner P: **Inflammatory cytokines stimulate adrenomedullin expression through nitric oxide-dependent and -independent pathways.** *Hypertension* 2002, **39**(1):161-167.
  139. Burley DS, Hamid SA, Baxter GF: **Cardioprotective actions of peptide hormones in myocardial ischemia.** *Heart Fail Rev* 2007, **12**(3-4):279-291.
  140. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Oya H, Kyotani S, Sakamaki F, Ueno K, Nakanishi N, Miyatake K *et al*: **Haemodynamic and hormonal**

- effects of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Heart* 2000, **84**(6):653-658.
141. Kato J, Kitamura K: **Bench-to-bedside pharmacology of adrenomedullin.** *Eur J Pharmacol* 2015, **764**:140-148.
142. Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, Nagaya N, Noguchi T, Yamada N, Morii I, Kawamura A, Doi K, Miyatake K *et al*: **The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2010, **56**(4):413-419.
143. Bell D, Campbell M, Wang X, Earle JA, Cosby SL, McDermott BJ: **Adrenomedullin gene delivery is cardio-protective in a model of chronic nitric oxide deficiency combining pressure overload, oxidative stress and cardiomyocyte hypertrophy.** *Cell Physiol Biochem* 2010, **26**(3):383-394.
144. Kato J, Tsuruda T, Kita T, Kitamura K, Eto T: **Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(12):2480-2487.
145. Kuwasako K, Shimekake Y, Masuda M, Nakahara K, Yoshida T, Kitaura M, Kitamura K, Eto T, Sakata T: **Visualization of the calcitonin receptor-like receptor and its receptor activity-modifying proteins during internalization and recycling.** *J Biol Chem* 2000, **275**(38):29602-29609.
146. Hiragushi K, Wada J, Eguchi J, Matsuoka T, Yasuhara A, Hashimoto I, Yamashita T, Hida K, Nakamura Y, Shikata K *et al*: **The role of adrenomedullin and receptors in glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Kidney Int* 2004, **65**(2):540-550.
147. Tam CW, Husmann K, Clark NC, Clark JE, Lazar Z, Ittner LM, Gotz J, Douglas G, Grant AD, Sugden D *et al*: **Enhanced vascular responses to adrenomedullin in mice overexpressing receptor-activity-modifying protein 2.** *Circ Res* 2006, **98**(2):262-270.
148. Chao J, Jin L, Lin KF, Chao L: **Adrenomedullin gene delivery reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertens Res* 1997, **20**(4):269-277.
149. Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Cao Y, Marutsuka K, Asada Y, Kangawa K, Eto T: **Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats.** *Circulation* 2004, **110**(4):426-431.
150. Liang L, Tam CW, Pozsgai G, Siow R, Clark N, Keeble J, Husmann K, Born W, Fischer JA, Poston R *et al*: **Protection of angiotensin II-induced vascular hypertrophy in vascular smooth muscle-targeted receptor activity-modifying protein 2 transgenic mice.** *Hypertension* 2009, **54**(6):1254-1261.
151. Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Kuwasako K, Imamura T, Koiwaya Y, Tsuji T, Kangawa K, Eto T: **Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine**

- inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes.** *Hypertension* 1998, **31**(1 Pt 2):505-510.
152. Yamaguchi T, Baba K, Doi Y, Yano K: **Effect of adrenomedullin on aldosterone secretion by dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells.** *Life Sci* 1995, **56**(6):379-387.
  153. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM: **Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development.** *J Clin Invest* 2008, **118**(1):40-50.
  154. Watkins HA, Chakravarthy M, Abhayawardana RS, Gingell JJ, Garelja M, Pardamwar M, McElhinney JM, Lathbridge A, Constantine A, Harris PW *et al*: **Receptor Activity-modifying Proteins 2 and 3 Generate Adrenomedullin Receptor Subtypes with Distinct Molecular Properties.** *J Biol Chem* 2016, **291**(22):11657-11675.
  155. Takahashi K, Udono-Fujimori R, Totsune K, Murakami O, Shibahara S: **Suppression of cytokine-induced expression of adrenomedullin and endothelin-1 by dexamethasone in T98G human glioblastoma cells.** *Peptides* 2003, **24**(7):1053-1062.
  156. Yanagawa B, Nagaya N: **Adrenomedullin: molecular mechanisms and its role in cardiac disease.** *Amino Acids* 2007, **32**(1):157-164.
  157. Garayoa M, Martinez A, Lee S, Pio R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga LM, Ryan H, Johnson R *et al*: **Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**(6):848-862.
  158. Eguchi S, Hirata Y, Iwasaki H, Sato K, Watanabe TX, Inui T, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F: **Structure-activity relationship of adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in cultured rat vascular smooth muscle cells.** *Endocrinology* 1994, **135**(6):2454-2458.
  159. Watanabe TX, Itahara Y, Inui T, Yoshizawa-Kumagaye K, Nakajima K, Sakakibara S: **Vasopressor activities of N-terminal fragments of adrenomedullin in anesthetized rat.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **219**(1):59-63.
  160. Lin B, Gao Y, Chang JK, Heaton J, Hyman A, Lipton H: **An adrenomedullin fragment retains the systemic vasodepressor activity of rat adrenomedullin.** *Eur J Pharmacol* 1994, **260**(1):1-4.
  161. Champion HC, Fry RC, Murphy WA, Coy DH, Kadowitz PJ: **Catecholamine release mediates pressor effects of adrenomedullin-(15-22) in the rat.** *Hypertension* 1996, **28**(6):1041-1046.
  162. Robinson SD, Aitken JF, Bailey RJ, Poyner DR, Hay DL: **Novel peptide antagonists of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide**

- receptors: identification, pharmacological characterization, and interactions with position 74 in receptor activity-modifying protein 1/3. *J Pharmacol Exp Ther* 2009, **331**(2):513-521.
163. Dackor RT, Fritz-Six K, Dunworth WP, Gibbons CL, Smithies O, Caron KM: **Hydrops fetalis, cardiovascular defects, and embryonic lethality in mice lacking the calcitonin receptor-like receptor gene.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(7):2511-2518.
164. Caron KM, Smithies O: **Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(2):615-619.
165. Joseph J Gingell JS, James Barwell, David R Poyner, Harriet A Watkins, Augen A Pioszak, Patrick M Sexton, Debbie L Hay: **An allosteric role for receptor activity-modifying proteins in defining GPCR pharmacology.** *Cell discovery* May 2016, **2**:1.
166. Cueille C, Birot O, Bigard X, Hagner S, Garel JM: **Post-transcriptional regulation of CRLR expression during hypoxia.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **326**(1):23-29.
167. Hwang IS, Fung ML, Liong EC, Tipoe GL, Tang F: **Age-related changes in adrenomedullin expression and hypoxia-inducible factor-1 activity in the rat lung and their responses to hypoxia.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007, **62**(1):41-49.
168. Ross GR, Chauhan M, Gangula PR, Reed L, Thota C, Yallampalli C: **Female sex steroids increase adrenomedullin-induced vasodilation by increasing the expression of adrenomedullin2 receptor components in rat mesenteric artery.** *Endocrinology* 2006, **147**(1):389-396.
169. Miller MJ, Martinez A, Unsworth EJ, Thiele CJ, Moody TW, Elsasser T, Cuttitta F: **Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor.** *J Biol Chem* 1996, **271**(38):23345-23351.
170. Dupuis J, Caron A, Ruel N: **Biodistribution, plasma kinetics and quantification of single-pass pulmonary clearance of adrenomedullin.** *Clin Sci (Lond)* 2005, **109**(1):97-102.
171. Harel F, Fu Y, Nguyen QT, Letourneau M, Perrault LP, Caron A, Fournier A, Dupuis J: **Use of adrenomedullin derivatives for molecular imaging of pulmonary circulation.** *J Nucl Med* 2008, **49**(11):1869-1874.
172. Asada Y, Hara S, Marutsuka K, Kitamura K, Tsuji T, Sakata J, Sato Y, Kisanuki A, Eto T, Sumiyoshi A: **Novel distribution of adrenomedullin-immunoreactive cells in human tissues.** *Histochem Cell Biol* 1999, **112**(3):185-191.

173. Hwang IS, Tang F: **Peripheral distribution and gene expression of adrenomedullin in the rat: possible source of blood adrenomedullin.** *Neuropeptides* 2000, **34**(1):32-37.
174. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T: **Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **194**(2):720-725.
175. Conner AC, Simms J, Hay DL, Mahmoud K, Howitt SG, Wheatley M, Poyner DR: **Heterodimers and family-B GPCRs: RAMPs, CGRP and adrenomedullin.** *Biochem Soc Trans* 2004, **32**(Pt 5):843-846.
176. Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE: **Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues.** *Cell Tissue Res* 2002, **310**(1):41-50.
177. Martinez A, Miller MJ, Catt KJ, Cuttitta F: **Adrenomedullin receptor expression in human lung and in pulmonary tumors.** *J Histochem Cytochem* 1997, **45**(2):159-164.
178. Owji AA, Smith DM, Coppock HA, Morgan DG, Bhogal R, Ghatei MA, Bloom SR: **An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat.** *Endocrinology* 1995, **136**(5):2127-2134.
179. Dschietzig T, Azad HA, Asswad L, Bohme C, Bartsch C, Baumann G, Stangl K: **The adrenomedullin receptor acts as clearance receptor in pulmonary circulation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **294**(2):315-318.
180. Letourneau M, Nguyen QT, Harel F, Fournier A, Dupuis J: **Pulmobind, an adrenomedullin-based molecular lung imaging tool.** *Journal of Nuclear Medicine* In press.
181. Wolf HK, Tuomilehto J, Kuulasmaa K, Domarkiene S, Cepaitis Z, Molarius A, Sans S, Dobson A, Keil U, Rywik S: **Blood pressure levels in the 41 populations of the WHO MONICA Project.** *J Hum Hypertens* 1997, **11**(11):733-742.
182. Yoshihara F, Nishikimi T, Horio T, Yutani C, Takishita S, Matsuo H, Ohe T, Kangawa K: **Chronic infusion of adrenomedullin reduces pulmonary hypertension and lessens right ventricular hypertrophy in rats administered monocrotaline.** *Eur J Pharmacol* 1998, **355**(1):33-39.
183. Almquist HM, Palmer J, Jonson B, Wollmer P: **Pulmonary perfusion and density gradients in healthy volunteers.** *J Nucl Med* 1997, **38**(6):962-966.
184. Hakim TS, Dean GW, Lisbona R: **Effect of body posture on spatial distribution of pulmonary blood flow.** *J Appl Physiol* 1988, **64**(3):1160-1170.
185. Glenny R: **Counterpoint: Gravity is not the major factor determining the distribution of blood flow in the healthy human lung.** *J Appl Physiol* 2008, **104**(5):1533-1535; discussion 1535-1536.

186. Glenny R: **Last word on Point:Counterpoint: Gravity is/is not the major factor determining the distribution of blood flow in the human lung.** *J Appl Physiol* 2008, **104**(5):1540.
187. Hughes M, West JB: **Last word on Point:Counterpoint: Gravity is/is not the major factor determining the distribution of blood flow in the human lung.** *J Appl Physiol* 2008, **104**(5):1539.
188. Hughes M, West JB: **Point: Gravity is the major factor determining the distribution of blood flow in the human lung.** *J Appl Physiol* 2008, **104**(5):1531-1533.
189. Wagner WW, Jr.: **Point:Counterpoint: Gravity is/is not the major factor determining the distribution of blood flow in the human lung.** *J Appl Physiol* 2008, **104**(5):1537.
190. Harel F, Levac X, Nguyen QT, Letourneau M, Marcil S, Finnerty V, Cossette M, Fournier A, Dupuis J: **Molecular imaging of the human pulmonary vascular endothelium using an adrenomedullin receptor ligand.** *Mol Imaging* 2015, **14**.
191. Glenny RW, Bernard S, Robertson HT, Hlastala MP: **Gravity is an important but secondary determinant of regional pulmonary blood flow in upright primates.** *J Appl Physiol* 1999, **86**(2):623-632.
192. Glenny RW, Robertson HT: **Determinants of pulmonary blood flow distribution.** *Compr Physiol* 2011, **1**(1):39-59.
193. Glenny RW, Robertson HT: **Fractal modeling of pulmonary blood flow heterogeneity.** *Journal of Applied Physiology* 1991, **70**(3):1024-1030.
194. Merabet N, Nguyen QT, Marcil S, Meloche B, Shi YF, Tardif J, Harel F, Dupuis J: **Molecular SPECT imaging of early angioproliferative group I pulmonary arterial hypertension using an adrenomedullin receptor ligand.** *Circulation* 2014, **130**:A17020.
195. Petersson J, Sanchez-Crespo A, Larsson SA, Mure M: **Physiological imaging of the lung: single-photon-emission computed tomography (SPECT).** *J Appl Physiol* 2007, **102**(1):468-476.
196. Maeda H, Itoh H, Ishii Y, Todo G, Mukai T, Fujita M, Kambara H, Kawai C, Torizuka K: **Pulmonary blood flow distribution measured by radionuclide-computed tomography.** *J Appl Physiol* 1983, **54**(1):225-233.
197. Nyren S, Mure M, Jacobsson H, Larsson SA, Lindahl SG: **Pulmonary perfusion is more uniform in the prone than in the supine position: scintigraphy in healthy humans.** *J Appl Physiol* 1999, **86**(4):1135-1141.
198. Petersson J, Rohdin M, Sanchez-Crespo A, Nyren S, Jacobsson H, Larsson SA, Lindahl SG, Linnarsson D, Neradilek B, Polissar NL *et al*: **Regional lung blood flow and ventilation in upright humans studied with quantitative SPECT.** *Respir Physiol Neurobiol* 2009, **166**(1):54-60.

199. Lisbona R, Dean GW, Hakim TS: **Observations with SPECT on the normal regional distribution of pulmonary blood flow in gravity independent planes.** *J Nucl Med* 1987, **28**(11):1758-1762.
200. Prisk GK, Guy HJ, Elliott AR, West JB: **Inhomogeneity of pulmonary perfusion during sustained microgravity on SLS-1.** *J Appl Physiol* 1994, **76**(4):1730-1738.
201. Lau EM, Bailey DL, Bailey EA, Torzillo PJ, Roach PJ, Schembri GP, Corte TJ, Celermajer DS: **Pulmonary hypertension leads to a loss of gravity dependent redistribution of regional lung perfusion: a SPECT/CT study.** *Heart* 2014, **100**(1):47-53.
202. Savarese G, Paolillo S, Costanzo P, D'Amore C, Cecere M, Losco T, Musella F, Gargiulo P, Marciano C, Perrone-Filardi P: **Do changes of 6-minute walk distance predict clinical events in patients with pulmonary arterial hypertension? A meta-analysis of 22 randomized trials.** *J Am Coll Cardiol* 2012, **60**(13):1192-1201.
203. SERVICES USDOHAH: **Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0.** In. Edited by Health NIo; June 14, 2010.
204. Bassett M: **Radiotracer price increase roils nuclear medicine community,** <http://www.fiercehealthcare.com/it/radiotracer-price-increase-roils-nuclear-medicine-community>, 2014.
205. Fukuchi K, Hayashida K, Nakanishi N, Inubushi M, Kyotani S, Nagaya N, Ishida Y: **Quantitative analysis of lung perfusion in patients with primary pulmonary hypertension.** *J Nucl Med* 2002, **43**(6):757-761.
206. Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron KM: **Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**(4):783-796.
207. D. Visvikis, F. Lamare, P. Bruyant, A. Turzo, Y. Bizais, C. Cheze Le Rest: **Correction de mouvement respiratoire en TEP/TDM.** *Médecine Nucléaire* 2007, **Volume 31, Issue 4,**
208. Levin DL, Buxton RB, Spiess JP, Arai T, Balouch J, Hopkins SR: **Effects of age on pulmonary perfusion heterogeneity measured by magnetic resonance imaging.** *J Appl Physiol (1985)* 2007, **102**(5):2064-2070.
209. Lau EM, Manes A, Celermajer DS, Galie N: **Early detection of pulmonary vascular disease in pulmonary arterial hypertension: time to move forward.** *Eur Heart J* 2011, **32**(20):2489-2498.
210. American College of Emergency Physicians Clinical Policies C, Clinical Policies Committee Subcommittee on Suspected Pulmonary E: **Clinical policy: critical issues in the evaluation and management of adult patients**

- presenting with suspected pulmonary embolism. *Ann Emerg Med* 2003, **41**(2):257-270.
211. Harel F, Langleben D, Provencher S, Fournier A, Finnerty V, Nguyen QT, Letourneau M, Levac X, Abikhzer G, Guimond J *et al*: **Molecular imaging of the human pulmonary vascular endothelium in pulmonary hypertension: a phase II safety and proof of principle trial.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017.
212. Noz ME, Kramer EL, Maguire GQ, Jr., McGee SA, Sanger JJ: **An integrated approach to biodistribution radiation absorbed dose estimates.** *Eur J Nucl Med* 1993, **20**(2):165-169.