

Université de Montréal

**Validation de modalités d'imagerie innovantes de l'athérosclérose  
par cathéter intravasculaire bimodal combinant fluorescence  
(NIRF) et ultrasons (IVUS) couplé à l'injection locale de sondes  
moléculaires *in vivo* ciblant ICAM-1 et le collagène.**

par

**Marie-Jeanne Bertrand**

Département des Sciences biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D  
en Sciences biomédicales, option générale

Décembre, 2018

© Marie-Jeanne Bertrand, 2018

Université de Montréal

*Cette thèse intitulée*

**Validation de modalités d'imagerie innovantes de l'athérosclérose par cathéter intravasculaire bimodal combinant fluorescence (NIRF) et ultrasons (IVUS) couplé à l'injection locale de sondes moléculaires *in vivo* ciblant ICAM-1 et le collagène.**

*Présentée par*

**Marie-Jeanne Bertrand**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Dr Yahye Merhi**

Président-rapporteur

**Dr Jean-Claude Tardif**

Directeur de recherche

**Dr Frédéric Lesage**

Codirecteur de recherche

**Dr Philippe L.-L'Allier**

Codirecteur de recherche

**Dr Jean Provost**

Membre du jury

**Dr Olivier F. Bertrand**

Évaluateur externe

# RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité à l'échelle mondiale, dont la survenue de l'infarctus du myocarde et de la mort subite découle majoritairement de la rupture d'une plaque d'athérosclérose coronarienne vulnérable. Les modalités d'imagerie invasive contemporaines permettent d'analyser les caractéristiques anatomiques et morphologiques de la plaque d'athérome, mais ne révèlent aucune information sur la biologie de l'athérogenèse. Ainsi, l'identification des déterminant moléculaires et cellulaires définissant la plaque à haut risque de rupture est l'approche de choix afin d'améliorer nos connaissances sur la maladie coronarienne et pour l'optimisation des traitements actuels. L'objectif principal de ce projet de recherche visait à démontrer la faisabilité d'une technique d'imagerie moléculaire innovante par cathéter bimodal IVUS-NIRF couplé à l'utilisation de sondes d'imagerie ciblant spécifiquement l'inflammation (ICAM-1) et la composition de la plaque d'athérosclérose (fibres de collagène type-I non polymérisées) dans deux modèles animaux distincts de l'athérosclérose.

Les résultats préliminaires contenus dans cette thèse décrivent une technique d'imagerie intravasculaire originale et novatrice permettant la détection *in vivo* par cathéter de biomarqueurs de l'inflammation et de la composition de la plaque d'athérosclérose à l'aide de traceurs moléculaires fluorescents spécifiques injectés en faible concentration au sein de plaques visualisées par IVUS. Permettant de discriminer avec précision le signal NIRF, le système d'imagerie par cathéter IVUS-NIRF exploité dans ce projet de recherche permet un multiplexage précis du signal NIRF suivant l'injection simultanée de sondes couplées à des fluorophores distincts, offrant la possibilité de cibler simultanément un panel de biomarqueurs à haut risque au sein d'une même plaque d'athérosclérose. Ainsi, cette application d'imagerie moléculaire *in vivo* est une stratégie prometteuse dont la translation en clinique permettrait d'identifier les processus biologiques clés impliqués dans l'instabilité de la plaque d'athérosclérose coronarienne humaine, un besoin à combler dans la pratique clinique.

**Mots-clés :** athérosclérose, plaque vulnérable, ICAM-1, collagène de type-I, sondes moléculaires, biomarqueurs, fluorescence proche infrarouge (NIRF), ultrasonographie intravasculaire (IVUS).

# ABSTRACT

Cardiovascular disease is the leading cause of mortality worldwide, with the onset of myocardial infarction and sudden death resulting mainly from the rupture of a vulnerable coronary atherosclerotic plaque. Contemporary invasive imaging modalities enable analysis of anatomical and morphological characteristics of the atheroma plaque without providing information on the biology of atherosclerosis. Thus, the identification of molecular and cellular determinants defining high-risk plaques is a promising approach to improve our current knowledge of coronary heart disease and to optimize patient treatment. This research project aimed to demonstrate the feasibility of a novel molecular imaging technique using a custom bimodal intravascular ultrasound (IVUS) – near-infrared fluorescence (NIRF) catheter imaging system combined to local injection of labeled-specific imaging probes targeting both inflammation (ICAM-1) and plaque composition (unpolymerized type I collagen fibers) in two distinct atherosclerotic animal models.

Preliminary results presented in this thesis describe an original and novel intravascular imaging technique for *in vivo* detection of inflammation and plaque morphology using specific fluorescent molecular tracers injected in low concentration in the vicinity of plaques visualized by IVUS. The bimodal IVUS-NIRF imaging catheter system used in this project enables accurate NIRF signal multiplexing following dual-injection of molecular probes coupled to distinct fluorophores, which might offer the possibility of targeting a panel of high-risk biomarkers simultaneously within in a single atherosclerotic plaque. Thus, this *in vivo* molecular imaging application is a promising strategy that could translate to future human studies with the purpose to identify key biological processes involved in human coronary atherosclerotic plaque instability, an unmet need in clinical practice.

**Keywords:** atherosclerosis, vulnerable plaque, ICAM-1, type-I collagen, biomarkers, molecular probes, near-infrared fluorescence (NIRF), intravascular ultrasound (IVUS).

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xxi
INTRODUCTION .....	1
Mise en contexte.....	1
<b>CHAPITRE 1. La maladie coronarienne athérosclérotique – une entité parmi les maladies     cardiovasculaires.....</b>	<b>5</b>
1.1. Contexte et épidémiologie.....	5
1.2. Anatomie et physiologie coronarienne.....	7
1.3. Pathophysiologie .....	12
1.4. Étiologies.....	15
1.5. Facteurs de risque.....	16
1.6. Présentation clinique .....	17
1.6.1. Histoire clinique .....	17
1.6.2. Examen physique.....	19
1.6.3. Probabilité pré-test de maladie coronarienne athérosclérotique.....	22
1.7. Investigations.....	23
1.7.1. Électrocardiogramme (ECG).....	26
1.7.2. Épreuve d’effort.....	27
1.7.3. Biomarqueurs cardiaques .....	28
1.7.4. Modalités d’imagerie non invasives .....	30

1.7.5. Modalité d'imagerie invasive – l'angiographie coronarienne.....	39
1.8. Diagnostic différentiel.....	42
1.9. Traitements de la MCAS.....	42
1.9.1. Traitements non pharmacologiques.....	43
1.9.2. Traitements pharmacologiques.....	46
<b>CHAPITRE 2. La biologie vasculaire de l'athérosclérose.....</b>	<b>52</b>
2.1. Histologie des artères.....	52
2.2. Inflammation et initiation de l'athérosclérose.....	54
2.2.1. Dysfonction endothéliale et accumulation des lipides.....	54
2.2.2. Recrutement, adhésion et transmigration des leucocytes.....	55
2.2.3. Formation des cellules spumeuses et des stries lipidiques.....	59
2.3. Évolution de la plaque d'athérosclérose.....	59
2.3.1. Progression de la plaque d'athérosclérose et remodelage positif.....	59
2.3.2. Le centre nécrotique.....	61
2.3.3. La chape fibreuse.....	63
2.3.5. Déterminants de l'instabilité de la plaque.....	64
2.4. Complications de l'athérosclérose.....	67
2.4.1. Sténose coronaire et ischémie myocardique.....	67
2.4.2. Rupture de plaque et thrombose.....	68
2.4.3. Nodule calcifié.....	70
2.4.4. Érosion de plaque.....	70
2.5. Guérison de la plaque.....	70
<b>CHAPITRE 3. Diverses modalités d'imagerie invasives de la plaque d'athérosclérose coronarienne.....</b>	<b>71</b>
3.1. Modalités d'imagerie invasives utilisées en clinique.....	71
3.1.1. Ultrasonographie intravasculaire (IVUS).....	71
3.1.2. Ultrasonographie intravasculaire par radiofréquence (RF-IVUS).....	72
3.1.3. Tomographie par cohérence optique (OCT).....	74
3.1.4. Spectroscopie proche infrarouge (NIRS).....	75

3.2. Technologies d'imagerie en émergence de la plaque d'athérosclérose.....	78
3.2.1. Modalités d'imagerie invasives .....	78
3.2.2. Modalités d'imagerie non invasives combinées : TEP-TDM et TEP-IRM.....	88
<b>CHAPITRE 4. L'imagerie moléculaire en athérosclérose .....</b>	<b>91</b>
4.1. Les agents d'imagerie.....	91
4.2. Plateformes d'imagerie.....	92
4.3. Cibles moléculaires de la plaque d'athérome inflammatoire .....	92
4.3.1. Activation de l'endothélium et adhésion cellulaire .....	92
4.3.2. Activation des macrophages et cellules spumeuses .....	95
4.3.3. Cellules spumeuses, LDL et stress oxydatif.....	98
4.3.4. L'activité des protéases .....	99
4.3.5. Matrice extracellulaire.....	100
4.3.6. L'apoptose .....	100
4.3.7. Angiogenèse .....	101
4.3.8. Microcalcifications .....	102
4.3.9. Thrombose.....	102
<b>CHAPITRE 5. Validation de l'histologie 3D <i>ex vivo</i>.....</b>	<b>103</b>
5.1. Principe.....	103
5.2. Le système d'imagerie.....	104
<b>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>105</b>
1. Hypothèses .....	105
2. Objectif principal.....	106
2.1. Objectifs secondaires .....	106
<b>MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>107</b>
1. Modèles animaux.....	107
1.1. Lapins athérosclérotiques .....	107

1.2. Porcs miniatures diabétiques .....	108
2. Sondes moléculaires .....	110
2.1. ICAM-1 .....	110
2.2. Collagène .....	111
3. Cathéter d'imagerie IVUS-NIRF .....	112
4. Imagerie intravasculaire <i>in vivo</i> par cathéter IVUS-NIRF .....	112
4.1. Lapins .....	112
4.2. Porcs .....	114
5. Analyse des images acquises par imagerie IVUS-NIRF <i>in vivo</i> .....	117
6. Imagerie en fluorescence <i>ex vivo</i> .....	117
7. Histologie 3D <i>ex vivo</i> des artères coronaires porcines .....	118
8. Histologie conventionnelle .....	119
9. Immunohistochimie de ICAM-1 .....	120
9.1. Aortes abdominales de lapins .....	120
10. Analyses statistiques .....	121
11. Éthique animale .....	121
 ARTICLES .....	 122
1. Étude #1 .....	122
2. Étude #2 .....	156
3. Étude #3 .....	207
 DISCUSSION .....	 236
1. Modèles animaux sélectionnés pour les fins de l'étude .....	237
1.1. Modèle de dénudation au ballon des lapins athérosclérotiques .....	237
1.2. Porcs diabétiques et hypercholestérolémiques .....	238
2. Biomarqueurs d'imagerie à l'étude : pourquoi cibler ICAM-1 et le collagène de type-I non polymérisé? .....	240

3.	Validation de la technique d'imagerie <i>in vivo</i> IVUS-NIRF couplée à des sondes moléculaires : est-ce que cette modalité d'imagerie détecte spécifiquement les biomarqueurs ciblés?.....	241
3.1.	Sensibilité et spécificité du signal NIRF <i>in vivo</i> .....	241
3.2.	Validation du signal NIRF par FRI <i>ex vivo</i> .....	242
3.3.	Validation <i>ex vivo</i> du ciblage de ICAM-1 .....	243
3.4.	Validation <i>ex vivo</i> du ciblage de ICAM-1 par une plateforme d'histologie massive .....	244
4.	L'imagerie moléculaire intravasculaire de l'athérosclérose par NIR-fluorescence (NIRF): la modalité d'imagerie <i>in vivo</i> du futur?.....	244
4.1.	Le système d'imagerie par cathéter IVUS-NIRF .....	245
4.2.	Les sondes moléculaires d'imagerie ciblées.....	246
5.	Translation de la technique d'imagerie intravasculaire chez l'humain : une application clinique envisageable?.....	247
5.1.	La cinétique des sondes d'imagerie moléculaire .....	247
5.2.	Technique d'injection <i>in situ</i> des sondes d'imagerie moléculaire.....	249
	CONCLUSION.....	252
	LIMITATIONS.....	253
	PERSPECTIVES .....	257
	BIBLIOGRAPHIE.....	259
	ANNEXE 1.....	i

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b>	Causes de l'infarctus du myocarde sans maladie coronarienne athérosclérotique.....	15
<b>Tableau II.</b>	Facteurs de risque modifiables et non modifiables des maladies cardiovasculaires.....	16
<b>Tableau III.</b>	Classification modifiée de la Société Canadienne de Cardiologie du degré de sévérité de l'angine pectorale.....	18
<b>Tableau IV.</b>	Probabilité pré-test de MCAS chez les patients symptomatiques selon le sexe et l'âge.....	23
<b>Tableau V.</b>	Sensibilité et spécificité des examens non invasifs à l'effort pour le diagnostic de la MCAS.....	24
<b>Tableau VI.</b>	Stratification du risque CV en fonction des modalités d'investigation non invasives.....	25
<b>Tableau VII.</b>	Diagnostic différentiel chez les patients présentant des douleurs thoraciques.....	42
<b>Tableau VIII.</b>	Recommandations de <i>Hypertension Canada</i> sur les valeurs seuils de tension artérielle (TA) pour initier un traitement et les cibles thérapeutiques à atteindre chez l'adulte .....	48
<b>Tableau IX.</b>	Comparaison des différentes modalités d'imagerie intravasculaire par cathéter pour la détection et caractérisation de la plaque d'athérosclérose .....	90
<b>Tableau X.</b>	Modalités d'imagerie moléculaire non invasives de l'athérosclérose .....	93

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Angiographie coronarienne de la coronaire gauche en projection OAD.....	1
<b>Figure 2.</b>	Distribution mondiale des décès selon les principales affections recensées, entre hommes et femmes, 2004 .....	5
<b>Figure 3.</b>	Distribution des maladies cardiovasculaires en fonction des décès recensés dans le monde en 2004 [1].....	6
<b>Figure 4.</b>	Anatomie des artères coronaires.....	8
<b>Figure 5.</b>	Circulation artérielle coronarienne, comprenant les artères épicaudiques et la microcirculation (artères pré-artériolaires et artérioles) .....	9
<b>Figure 6.</b>	Perfusion coronarienne durant le cycle cardiaque .....	10
<b>Figure 7.</b>	Autorégulation du flot sanguin coronarien en conditions basales et en stress métabolique .....	11
<b>Figure 8.</b>	La maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS).....	12
<b>Figure 9.</b>	Schéma temporel des changements biochimiques et structurels suivant la survenue d'un infarctus du myocarde .....	13
<b>Figure 10.</b>	Différenciation entre l'infarctus du myocarde (IDM) de type 1 et 2 selon d'anatomie de l'artère coronaire.....	14
<b>Figure 11.</b>	Représentation schématisée des ondes de la pression veineuse jugulaire (PVJ)..	20
<b>Figure 12.</b>	Quatre foyers de l'auscultation cardiaque .....	22
<b>Figure 13.</b>	Représentation des axes électriques du cœur .....	26

<b>Figure 14.</b>	Évaluation initiale des patients avec suspicion d'un syndrome coronarien aigu (SCA).....	29
<b>Figure 15.</b>	Échocardiographie de repos.....	32
<b>Figure 16.</b>	Angioscanner coronaire.....	34
<b>Figure 17.</b>	Scintigraphie myocardique.....	36
<b>Figure 18.</b>	TEP au Rubidium-82/FDG.....	37
<b>Figure 19.</b>	Images des structures cardiaques et des artères coronaires acquises par IRM.....	38
<b>Figure 20.</b>	Angiographie coronaire.....	40
<b>Figure 21.</b>	Mécanismes d'activation et d'inhibition plaquettaires.....	50
<b>Figure 22.</b>	Structure histologique d'une artère musculaire saine.....	52
<b>Figure 23.</b>	Cellule endothéliale vasculaire et les facteurs impliqués dans l'hémostase.....	53
<b>Figure 24.</b>	Processus d'extravasation des leucocytes circulants.....	55
<b>Figure 25.</b>	Molécules d'adhésion cellulaires impliquées dans la transmigration des leucocytes circulants.....	56
<b>Figure 26.</b>	Schéma de ICAM-1.....	57
<b>Figure 27.</b>	Initiation et progression de la plaque d'athérosclérose.....	59
<b>Figure 28.</b>	Structure du collagène fibrillaire. Constitué de trois chaînes alpha ( $\alpha$ ) assemblées en triple hélices.....	61
<b>Figure 29.</b>	Formation du centre nécrotique d'une plaque d'athérosclérose.....	62

<b>Figure 30.</b>	Métabolisme du collagène et de l'élastine dans la chape fibreuse d'une plaque d'athérosclérose .....	63
<b>Figure 31.</b>	Schématisation d'une plaque d'athérosclérose complexe .....	66
<b>Figure 32.</b>	Schéma de la plaque vulnérable, également appelée la plaque « popcorn » .....	69
<b>Figure 33.</b>	Images obtenues par différentes techniques d'imagerie IVUS .....	73
<b>Figure 34.</b>	Images acquises par OCT .....	75
<b>Figure 35.</b>	La combinaison de spectroscopie proche infrarouge (NIRS) à un cathéter IVUS.	77
<b>Figure 36.</b>	Comparaison d'images <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> en fluorescence proche infrarouge (NIRF) d'une aorte abdominale dénudée suivant l'injection d'ICG chez un modèle de lapin athérosclérotique.....	79
<b>Figure 37.</b>	Imagerie <i>in vivo</i> du contenu en lipides dans l'aorte abdominale d'un lapin athérosclérotique par photoacoustique intravasculaire (IVPA) combinée à l'ultrasonographie (IVUS).....	81
<b>Figure 38.</b>	Palpographie intravasculaire d'une artère coronaire humaine <i>in vivo</i> .....	83
<b>Figure 39.</b>	Nouvelles technologies en OCT .....	86
<b>Figure 40.</b>	Comparaison d'une plaque calcifiée dans un spécimen d'artère coronaire humaine <i>ex vivo</i> par : (a) histologie; (b) imagerie par IVUS (b) et; (c) par IRM intravasculaire (IV-MRI).....	87
<b>Figure 41.</b>	Cibles moléculaires d'imagerie de la plaque d'athérosclérose.....	94
<b>Figure 42.</b>	Protocole d'imagerie des lapins athérosclérotiques ayant subi une dénudation au ballon de l'aorte abdominale distale .....	108

- Figure 43.** Schématisation de l'injection *in situ* des sondes dans l'aorte abdominale distale, suivie de l'imagerie intravasculaire par cathéter bimodal IVUS-NIRF ..... 114
- Figure 44.** Protocole d'imagerie des pores diabétiques et athérosclérotiques à différents temps donnés ..... 115

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ACAT	Acylcholesterol acyltransferase
ACC	American College of Cardiology
ACIA	Agence canadienne de l'inspection des aliments
ACV	Accident cérébrovasculaire
ADP	Adénosine diphosphate
AHA	American Heart Association
AL	Amplatz right
APC	Antigen presenting cell
ATM	Atmosphère
BBG	Bloc de branche gauche
BRA	Bloqueur des récepteurs de l'angiotensine
$^{11}\text{C}$	Carbone-11
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
CAM	Cellular adhesion molecule
CCAC	Canadian Council on animal care
CCL2	Chemokine ligand 2
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CDA	Comité d'éthique animale
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CK	Créatine kinase
CK-MB	Créatine kinase – isoenzyme MB
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CMH-1	Complexe d'histocompatibilité-1
CNRC	Conseil National de recherches du Canada
$\text{CO}_2$	Dioxyde de carbone
COX1	Cyclo-oxygénase 1
CRP	Protéine C réactive

cTn	Troponines cardiaques
<sup>64</sup> Cu	Cuivre-64
CV	Cardiovasculaire
Cx	Artère circonflexe
DAPT	Double thérapie antiplaquettaire
ECG	Électrocardiogramme
Em	Émission
ESC	European Society of Cardiology
Ex	Excitation
F	French
FDA	Food and drug administration
FDG	Fluorodésoxyglucose
FeVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F-fluorodésoxyglucose
FFR	Réserve du débit fractionnaire
FMT	Fluorescent molecular tomography
<sup>18</sup> F	Fluor-18
G	Gramme
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUT1	Glucose transporter 1
<sup>64</sup> Gd	Gadolinium
H	Heures
H <sup>+</sup>	Hydrogène
HBAG	Hémibloc antérieur gauche
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
HRV	Human rhinovirus
hs-cTn	Troponine cardiaque à haute sensibilité
HTA	Hypertension artérielle
<sup>123</sup> I	Iode-123

<sup>124</sup> I	Iode-124
<sup>125</sup> I	Iode-125
<sup>131</sup> I	Iode-131
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ICG	Indocyanine green
ICP	Intervention coronarienne percutanée
ICT	Ischémie cérébrale transitoire
IDM	Infarctus du myocarde
IDTCFA	Intravascular ultrasound (IVUS)-derived thin-cap fibroatheroma (TCFA)
IECA	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IFN- $\gamma$	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-1 $\beta$	Interleukine-1 $\beta$
IL-8	Interleukine-8
IL-18	Interleukine-18
IM	Intramusculaire
IMAC	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
IMC	Indice de masse corporelle
<sup>111</sup> In	Indium-111
IRA	Insuffisance rénale aiguë
IRC	Insuffisance rénale chronique
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IVA	Interventriculaire antérieure
IV-MRI	Intravascular magnetic resonance imaging
IVP	Interventriculaire postérieure
IVPA	Photoacoustique intravasculaire
IVUS	Intravascular ultrasonography
IVUS-VH	Intravascular ultrasound – virtual histology
JR	Judkins right
Kg	Kilos

LCBI	Lipid core burden index
LCP	Lipid core plaque
LDL	Low-density lipoprotein
LOX-1	Lectin-type oxidized LDL receptor 1
Min	Minute
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDA2	Malondialdéhyde-2
MLD	Minimal lumen diameter
MMP	Métalloprotéinase
μOCT	Micro-optical coherence tomography
NF-κB	Nuclear factor-κB
NAD	Nicotinamide xviirederi dinucléotide
NIRAF	Near-infrared autofluorescence
NIRF	Near-infrared fluorescence
NIRS	Near-infrared spectroscopy
NO	Oxyde nitrique
NSTEMI	Infarctus du myocarde sans élévation du segment ST
OCT	Optical coherence tomography
OFDI	Optical frequency domain imaging
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORO	Oil Red O
oxLDL	LDL oxydés
O <sub>2</sub>	Oxygène
PAC	Pontage aorto-coronarien
PA <sub>i</sub>	Facteur inhibiteur du plasminogène
PAI-1	Facteur inhibiteur du plasminogène-1
PaO <sub>2</sub>	Pression partielle en oxygène
PCPB	Pression capillaire pulmonaire bloquée
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule

PfEMP-1	Plasmodium falciparum erythrocytes membrane protein-1
PGI <sub>2</sub> :	Prostacycline
PL	Postéro-latérale
PS	Phosphatidylsérine
PS-OCT	Polarized-sensitive OCT
PVC	Pression veineuse centrale
PVJ	Pression veineuse jugulaire
P2Y <sub>12</sub>	Récepteurs P2Y purinorécepteur 12
QCA	Quantitative coronary analysis
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RVG	Rétroventriculaire gauche
S	Seconde
SCA	Syndrome coronarien aigu
SCC	Société canadienne de cardiologie
sdAb	Anticorps à domaine unique
SGLT-2	Inhibiteur du co-transporteur 2 sodium-glucose
SPIO	Superparamagnetic iron oxide
SRA	Scavenger receptor class A
SSTR2	Somatostatin receptor 2
STEMI	Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
TA	Tension artérielle
TCFA	Plaque fibroathéromateuse avec chape fibreuse amincie
TDM	Tomodensitométrie
TD-OCT	Time-domain OCT
TEMP	Tomographie d'émission monophotonique
TEP	Tomodensitométrie par émission de positrons
TFG	Taux de filtration glomérulaire
TGF-β	Transforming growth factor β
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale alpha

t-PA	Facteur activateur du plasminogène
TPSO	Translocator protein
TxA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
<sup>99m</sup> Tc	Technetium-99
<sup>201</sup> Tl	Thallium-201
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor
VG	Ventricule gauche
VPN	Valeur prédictive négative
vW	von Willebrand
<sup>89</sup> Zr	Zirconium-89
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions

*The ones who are crazy enough to think that they can change the world, are the ones who do.*

*– Steve Jobs, 1955-2011 –*

# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, *Dr Jean-Claude Tardif*, pour m'avoir offert cette si belle et grande opportunité de réaliser un doctorat de sciences fondamentales au sein de son équipe à l'Institut de cardiologie de Montréal. J'aimerais particulièrement le remercier pour la confiance qu'il m'a octroyée à mener à terme ce grand projet de recherche. Il a été et demeure à ce jour un mentor que j'admire profondément et j'espère avoir la chance de collaborer de nouveau avec lui dans ma carrière future.

Je remercie également *Dr Frédéric Lesage*, co-directeur de ce projet de recherche, pour son aide tout au long de ce projet, pour sa disponibilité dans les moments importants de ma carrière et pour son appui dans la réalisation de ce projet. J'ai eu la chance d'apprendre beaucoup à ses côtés, notamment sur l'imagerie optique, et ce malgré ma réalité quotidienne qui demandait de départager mon temps entre la formation clinique et la recherche.

Mon second co-directeur de thèse de doctorat, *Dr Philippe Lavoie-L'Allier*, a également été un mentor à travers cette aventure. Il a su me faire découvrir et aimer la profession de cardiologue interventionnel, que je pratique aujourd'hui avec beaucoup de passion, et ce tout en partageant une autre passion qui était celle de la recherche en imagerie de la plaque d'athérosclérose coronarienne. Je n'aurais pu réaliser un projet d'une aussi grande envergure sans son aide, tout particulièrement ses habiletés techniques en interventions qui ont été une plus-value lors des sessions d'imagerie chez les gros animaux.

Parmi les collègues de recherche, j'aimerais tout spécialement remercier *Dr Maxime Abran*, ingénieur et co-concepteur du cathéter d'imagerie bimodal IVUS-NIRF, pour son implication à part entière dans le projet et pour avoir accepté de partager son expertise et son invention. J'aimerais également remercier *M. Foued Maafi* pour son aide précieuse dans les analyses en fluorescence *ex vivo* et pour son esprit critique très développé. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration et ces nombreux conseils judicieux à travers ce projet. J'ai

également apprécié collaborer avec *M. Pier-Luc Tardif* dans la validation d'une nouvelle modalité d'imagerie *ex vivo* et pour ma participation à titre de co-auteur à la rédaction de l'article 3 présenté dans cette thèse. Ses connaissances en imagerie optique m'ont souvent aidé à comprendre les principes de base qui étaient parfois, pour moi qui ne suis pas ingénieure, très abstraits.

*Dr David Busseuil* et *Dre Nolwenn Merlet* ont également été de très bons conseils dans ce projet et je les remercie également pour leur participation et expertise lors de sessions d'imagerie avec les petits animaux. Je remercie également *Dr Éric Rhéaume* pour sa participation active durant ce doctorat, notamment lors de l'élaboration de ce projet, pour son sens critique et pour le temps consacré à réviser certains résumés de recherche, manuscrits et présentations.

J'aimerais remercier *Dr Abedelnasser Abulrob*, *Dr Arbabi-Ghahroudi* et *Dr Feng Ni*, chercheurs au Conseil National en recherches du Canada, pour avoir partagé leurs innovations avec notre équipe de recherche et ainsi m'avoir permis d'utiliser les sondes moléculaires ciblées dans le cadre de ce projet de recherche.

*Mme Téodora Mihalache-Avram* et *Mme Pascale Geoffroy* ont été d'une aide précieuse et indispensable à la réalisation de cette thèse de recherche. Elles m'ont beaucoup appris à travers ces années de travail et ont été présentes à tous moments lorsque j'avais besoin de leur avis, de leur expertise et de leur support. J'ai adoré travailler et apprendre à leur côté et je réalise aujourd'hui la chance que j'ai eu de travailler avec ce duo de femmes compétentes et passionnées. Je garde en mémoire de très agréables souvenirs de tous ces bons moments passés avec elles en laboratoire.

Je dois également remercier toute l'équipe de l'animalerie, sans qui ce projet n'aurait jamais pu voir le jour. Ils m'ont beaucoup appris sur la recherche animale et étaient tous

impliqués activement avec la volonté de réussite de ce projet de recherche. Je remercie *M. Robert Clément* et *Mme Karine Nadeau* pour leur implication active dans la logistique et structure de ce projet à l'animalerie, d'avoir pris beaucoup de temps afin de s'assurer que les soins prodigués aux animaux étaient optimaux, que l'infrastructure était adaptée pour l'accueil de gros animaux, etc. Je remercie toute l'équipe pour leur temps dédié aux soins des animaux et de m'avoir transmis leurs connaissances – *Mme Vanessa Durocher-Granger*, *Mme Natacha Duquette*, *M. Marc-Antoine Gillis*, *Mlle Isabelle Croteau*, de même que les équipes du weekend, *Alexandre* et *Janick*. Je ne peux passer sous le silence l'implication de *Dr André-François Couture*, qui m'a beaucoup aidé à connaître, voire apprivoiser le modèle animal, à élaborer des plans de soins et à s'assurer du bien-être continu des animaux tout au long du protocole.

Je ne peux passer sous le silence tout le support, la confiance et l'affection que j'ai pu recevoir de ma nouvelle famille en Canada, c'est-à-dire de tous mes collègues et amis de l'Hôpital privée du Confluent à Nantes. *Dr Erwan Bressollette*, *Dr Luc Aguirre* et *Dr Ashok Tirouvanziam*, trois personnes d'exception, sont pour moi des mentors en cardiologie interventionnelle, sont une source d'inspiration dans ma profession et j'ai le privilège aujourd'hui de les avoir comme amis. Surnommée « *le Petit Caribou* » par l'équipe de cardiologie interventionnelle – *Mlle Claire Bléas*, *Mme Claire Trochon*, *M. Yoann Blais*, *Mlle Sylvia Manoury*, *Mme Sandra Leroy*, *Mme Cécile Jaunet*, *Mme Viviane Poulet*, *M. Yannick Ruaux*, *Mme Astrid Leray*, *Mme Carole Chaboy*, *Mme Léa Colombier*, *Mlle Manon Auger*, *Mlle Cassandra Moreau*, *Mme Marie Bézouarin*, *Mme Bérangère Faure*, *Mme Céline Gallard* et *Dre Corrine Roy* – Tous ont su me donner confiance en moi, ont été d'un grand support dans les moments difficiles, m'ont encouragé à poursuivre ma carrière dans le domaine de la cardiologie interventionnelle adulte qui me passionne tant et surtout, ont fait de moi la cardiologue d'intervention que je suis devenue aujourd'hui. Je leur dois beaucoup car ils ont transformé ma perception de la profession, de la vie et ont su me donner envie d'accomplir encore davantage !

En dernier lieu, j'aimerais remercier mes proches qui ont toujours été là pour m'encourager et me supporter à travers les moments parfois difficiles de la formation. Sans eux,

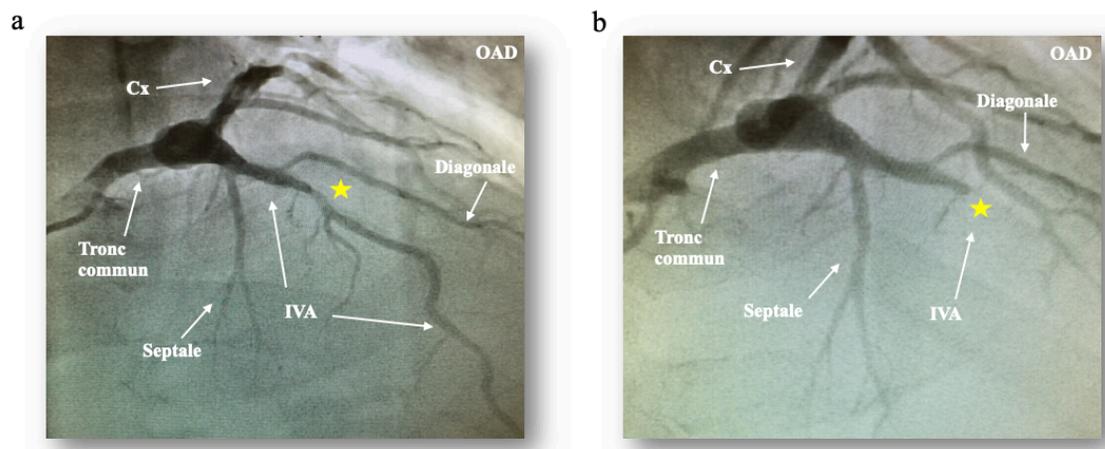
je n'aurais peut-être jamais entrepris cette grande aventure et surtout mener à terme ce si grand projet. Je remercie mon mari, *Dr George Honos*, une personne exceptionnelle à tous les niveaux qui a su m'encourager à travers ces années et qui a toujours cru en moi. Il est mon fort, ma bouée, mon rock. Je remercie également mes parents, *M. Pierre Bertrand* et *Mme Carole Desjardins*, qui m'ont toujours appuyé à travers ces longues années d'études et même, lors des derniers instants passés avec mon père, ce dernier a toujours démontré beaucoup de fierté à l'égard de ma réussite et m'a encouragé à ne jamais perdre de vue mes objectifs et mes rêves... « *Sky is the limit Marie, tu peux tout faire dans la vie, ne l'oublie jamais!* ». Je remercie également mes précieuses amies, *Me Isabelle Duval* et *Mme Elisabeth Almeida*, sans qui je n'aurais jamais eu la force de surmonter certaines épreuves très difficiles des dernières années. Elles sont pour moi plus que des amies, elles sont ma famille et je suis consciente du privilège que j'ai de les avoir dans ma vie!

# INTRODUCTION

## Mise en contexte

Malgré les avancées majeures dans les thérapies contemporaines observées dans la dernière décennie, les maladies cardiovasculaires demeurent la principale cause de mortalité à l'échelle mondiale et sont une préoccupation majeure de santé publique. En dépit de nos connaissances actuelles sur les processus inflammatoires et immunitaires impliqués dans l'athérogenèse, les déterminants impliqués dans l'instabilité et la vulnérabilité d'une plaque d'athérosclérose coronarienne demeurent inconnus. Bien que les modalités d'imagerie intravasculaire actuellement commercialisées ont permis de caractériser les propriétés morphologiques de la plaque d'athérome à haut risque *in vivo*, communément désignée *thin-cap fibroatheroma* (TCFA), elles ont failli à détecter précocement, prédire et de prévenir la rupture d'une plaque et la survenue d'un syndrome coronarien aigu. Cette problématique, omniprésente dans la pratique courante, illustre un besoin majeur à adresser afin d'améliorer la stratification, la prévention et la prise en charge des patients à risque d'événements cardiovasculaires adverses.

Voici un cas de figure illustrant les enjeux cliniques actuels :



**Figure 1.** Angiographie coronarienne de la coronaire gauche en projection OAD. (a) Présence d'une sténose au niveau du segment moyen de l'IVA, désignée par l'étoile jaune; (b) occlusion aiguë de l'IVA moyenne au site de la sténose non significative, désignée par l'étoile jaune. Cx : artère circonflexe; IVA : artère interventriculaire antérieure; OAD : oblique antérieure droite. Courtoisie du laboratoire d'hémodynamie de l'Institut de cardiologie de Montréal (2015).

- **Patient** : Homme âgé de 53 ans, électricien de profession, référé par son cardiologue traitant pour coronarographie diagnostique dans un contexte clinique d'angine stable depuis quelques semaines.
- **Facteurs de risque CV** : hypertension artérielle, dyslipidémie et obésité abdominale. Au questionnaire, il n'y a pas d'usage des produits du tabac et de drogue, et aucun antécédents familiaux de maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS).
- **Coronarographie diagnostique élective (janvier)** : sténose non significative au niveau de l'interventriculaire antérieur (IVA) moyenne, soit après la première artère diagonale (Figure 1a). L'évaluation physiologique de cette lésion est réalisée par mesure de la réserve du débit fractionnaire (FFR) et le résultat démontre qu'elle n'est pas hémodynamiquement significative.
- **Prise en charge clinique immédiate fut médicale**, soit d'inclure à son régime thérapeutique la prise quotidienne d'un antiplaquettaire (aspirine), d'une statine et d'un bêtabloquant, en plus des recommandations non pharmacologiques à suivre en prévention primaire.
- **Évolution clinique** : près de 10 mois suivant son évaluation par angiographie coronaire, le patient se présente en urgence dans un contexte d'un SCA avec sus-décalage du segment ST engendré par rupture de la plaque localisée à l'IVA moyenne (Figure 1b). Une prise en charge immédiate a permis de prodiguer une angioplastie par implantation d'un tuteur coronarien ayant rétabli la perfusion coronarienne et un renforcement du traitement médical fut effectué en cours d'hospitalisation. L'évolution clinique fut favorable et sans complication.

À la lumière du cas clinique ci-haut présenté, plusieurs interrogations subsistent sur le/es facteurs ayant contribué à la rupture de plaque et la survenue d'une thrombose aiguë de l'artère coronaire :

1. Comment évaluer la progression et le risque de rupture d'une plaque?
2. Quel(s) sont les biomarqueurs prédictifs de vulnérabilité d'une plaque?
3. Quel(s) facteur(s) précipite(nt) la rupture d'une plaque, autre que les déterminants de la composition/morphologie de celles-ci?
4. Avons-nous un ou plusieurs outils pour évaluer la biologie de la plaque? Quelle(s) modalités(s) d'imagerie à privilégier ?

Afin de pallier ces limitations, le projet de recherche présenté dans cette thèse a pour objectif principal de démontrer la faisabilité d'une technique novatrice d'imagerie moléculaire invasive par cathéter bimodal combinant l'ultrasonographie (IVUS) et la fluorescence proche infrarouge (NIRF) couplée à l'infusion locale *in vivo* de traceurs d'imagerie spécifiques ciblant la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et le collagène de type-I non polymérisé dans deux modèles animaux athérosclérotiques distincts. Les sous-objectifs de cette thèse visent à démontrer la faisabilité de la technique d'imagerie dans deux structures vasculaires distinctes, soient l'aorte abdominale de lapins et les artères coronaires porcines, à démontrer la sensibilité et spécificité de détection du signal en fluorescence par la plateforme d'imagerie par cathéter IVUS-NIRF suivant l'infusion *in vivo* de sondes moléculaires ciblées et la colocalisation du signal en fluorescence *in vivo* de ICAM-1 dans les artères coronaires porcines à l'aide d'une nouvelle plateforme d'histologie *ex vivo* en 3-dimensions (3D).

Les hypothèses qui sous-tendent cette thèse de doctorat sont les suivantes : (1) le développement d'une modalité d'imagerie hybride combinée à l'imagerie moléculaire permettra d'augmenter la sensibilité et spécificité diagnostique des modalités d'imagerie individuelle en évaluant simultanément les déterminants morphologiques et les processus immunobiologiques impliqués dans l'athérogenèse ; (2) l'infusion locale en petite quantité de traceurs d'imagerie distincts permettra d'obtenir un signal NIRF *in vivo* au sein de la plaque d'athérome et de le quantifier, et ; (3) une plateforme d'histologie 3D sera supérieure à l'histologie conventionnelle en générant une reconstruction complète de l'artère coronaire et de de la composition moléculaire de la paroi.

Cette thèse de doctorat comprend trois études originales, précédées d'une revue de la littérature exhaustive sur des aspects clés de ce projet de recherche, soient la maladie coronarienne athérosclérotique et ses enjeux cliniques, l'athérogenèse, les modalités d'imagerie invasives de l'athérosclérose et l'imagerie moléculaire la plaque d'athérome. Les deux premières études décrivent plusieurs aspects méthodologiques très novateurs liés au développement de la technique d'imagerie *in vivo* : (1) le développement de deux modèles animaux d'athérosclérose accélérée arborant des phénotypes distincts de la plaque; (2) ICAM-

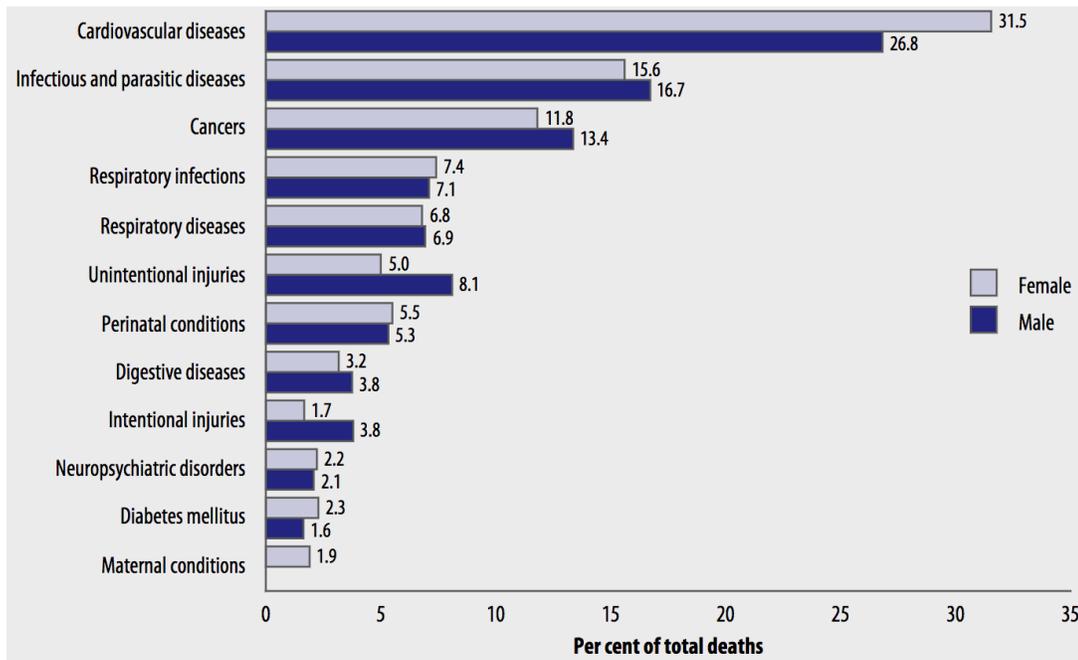
1 et le collagène de type-I non polymérisé comme biomarqueurs d'imagerie de la plaque permettant d'évaluer simultanément l'activité inflammatoire locale et l'un des constituants majeurs de la plaque/chape fibreuse; (3) l'application d'une technique d'infusion locale de sondes moléculaires par le biais d'un ballon cathéter microporeux et ses nombreux avantages, et; (4) la plateforme d'imagerie par cathéter combinant IVUS-NIRF et sa capacité à détecter et discriminer avec précision le signal NIRF *in vivo* émis par deux traceurs d'imagerie distincts. La dernière étude traite d'une nouvelle plateforme d'histologie 3D *ex vivo* qui pourrait servir d'outil de validation des biomarqueurs de l'athérosclérose *in vivo* en fournissant des informations anatomiques et moléculaires de haute résolution d'une artère coronaire entière. Enfin, la discussion traite des nombreux avantages de la modalité d'imagerie *in vivo* proposée, couplée à l'infusion locale de sondes moléculaires, par comparaison aux modalités d'imagerie anatomique actuelles, de même que son potentiel de translation en clinique. Les limitations encourues de la technique d'imagerie et les perspectives futures de ces travaux de recherche sont traitées en conclusion de la thèse.

L'évaluation des processus immunopathologiques de l'athérogenèse en temps réel par le biais d'une modalité d'imagerie *in vivo* hybride couplée à la fluorescence offre la possibilité d'évaluer un large éventail de biomarqueurs clés de vulnérabilité qui permettront d'améliorer la stratification du risque des patients vulnérables et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. La capacité de multiplexage du système d'imagerie, couplé à l'infusion de traceurs d'imagerie, permettra de cibler simultanément un panel de biomarqueurs associés à la déstabilisation et rupture de la plaque dans des études futures en imagerie de l'athérosclérose.

# 1. La maladie coronarienne athérosclérotique – une entité parmi les maladies cardiovasculaires

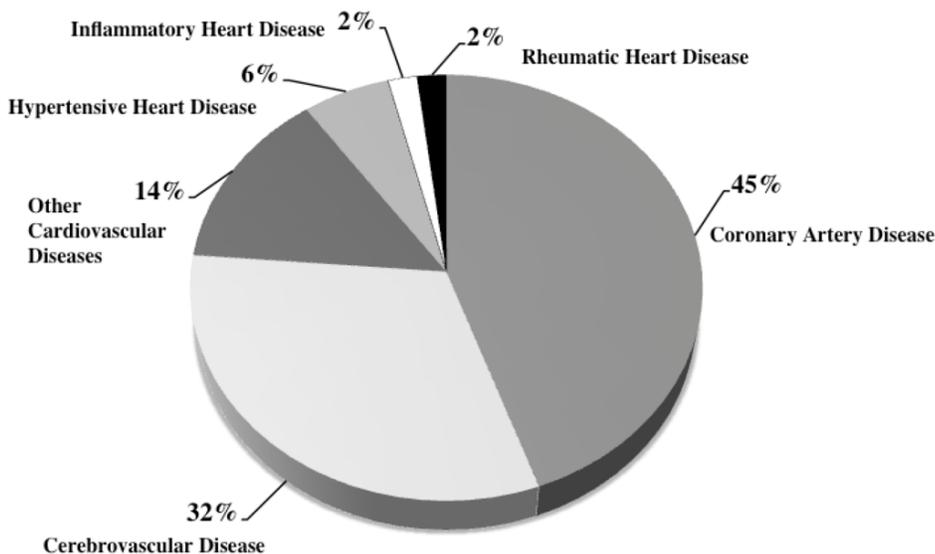
## 1.1. Contexte et épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires (CV), principalement la maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS) et la maladie cérébrovasculaire, sont la principale cause de morbidité et mortalité dans le monde, particulièrement chez les femmes [1]. En 2004, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait qu'environ 17 millions de décès recensés étaient imputables aux maladies cardiovasculaires, représentant près de 32% de la mortalité mondiale totale chez les femmes et 27% chez les hommes (Figure 2). Parmi ceux-ci, environ 7.2 millions étaient reliés à la coronaropathie, soient 45% de tous les décès CV (Figure 3).



**Figure 2.** Distribution mondiale des décès selon les principales affections recensées, entre hommes et femmes, 2004 [1].

A l'échelle mondiale, la prévalence des maladies cardiovasculaires ne cesse d'augmenter, mais de façon variable suivant les différents statuts socio-économiques des régions [1, 2]. Alors que les pays en voie de développement connaissent une transition épidémiologique de par l'industrialisation et l'urbanisation, l'avènement des changements comportementaux et des habitudes de vie mènent à une transition des pathologies infectieuses et de la dénutrition vers une recrudescence des maladies chroniques dégénératives telles que la maladie coronarienne athérosclérotique [2, 3]. Ainsi, l'amélioration des conditions de santé publique et nutritionnelles reflètent un changement démographique majeur se traduisant par une augmentation de l'espérance de vie, exposant ainsi les populations plus âgées aux facteurs de risque cardiovasculaires. En 2004, 80% des décès d'origine cardiovasculaires à l'échelle mondiale étaient recensés dans les pays en voie de développement [1, 4], dont la moitié de ceux-ci étaient secondaires à la MCAS [1]. De surcroît, dans les pays non occidentaux, les maladies cardiovasculaires semblent affecter les populations à un plus jeune âge et les décès surviennent généralement une à deux décades plus précocement que dans les pays occidentaux, pouvant ainsi imputer sur la productivité économique et sociale des régions [4, 5].



**Figure 3.** Distribution des maladies cardiovasculaires en fonction des décès recensés dans le monde en 2004 [1].

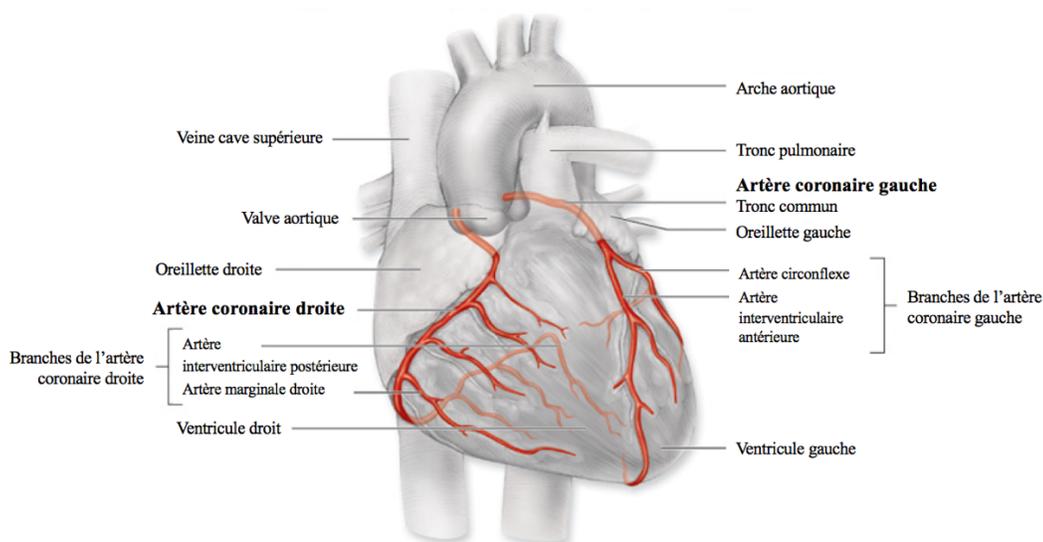
En contrepartie, depuis deux décennies, les taux de décès reliés à la MCAS ont décliné de façon substantielle, soit à plus de 60%, dans certains pays occidentaux tels que le Danemark, l’Australie, la Suède, les Pays-Bas et le Canada [1, 2]. Le fardeau économique sociétaire engendré par la maladie coronarienne demeure toutefois substantiel, soit par : (1) les coûts majeurs directs encourus par le système de santé (i.e. frais d’hospitalisation, traitements et prévention); (2) les frais indirects engendrés par l’impact financier d’un événement cardiovasculaire chez les patients (i.e. perte d’emploi, invalidité, coûts des soins, etc.) et; (3) l’impact sur la croissance économique et la productivité d’une société. En 2009, le coût total estimé pour les soins de santé liés à la MCAS aux Canada atteignait 165.4 milliards de dollars [6].

Malgré les avancés thérapeutiques de la dernière décennie, les maladies cardiovasculaires demeurent un réel problème de santé publique à l’échelle mondiale. L’OMS prédit un taux de mortalité relié aux maladies cardiovasculaires qui atteindra près de 23.4 millions d’individus en 2030 [1]. Ainsi, il est impératif de promouvoir la prévention cardiovasculaire et l’avancée des méthodes diagnostiques et thérapeutiques, enjeux majeurs des sociétés contemporaines actuelles, afin de réduire le fardeau socio-économique mondial en matière de maladies cardiovasculaires.

## **1.2. Anatomie et physiologie coronarienne**

La circulation artérielle coronarienne est composée de deux artères coronaires principales, soient l’artère coronaire gauche et l’artère coronaire droite, qui vascularisent le muscle cardiaque. Ces dernières, de même que leurs branches principales, sont situées à la surface du myocarde (i.e. artères épicaudiques) et donnent naissance à des branches pénétrant le myocarde (Figure 4). Les artères coronaires proviennent de la base de l’aorte ascendante à partir d’ouvertures appelées ostia coronaires situés derrière les feuillets de la valve aortique et vascularisent différents territoires myocardiques au moyen de multiples branches secondaires et ramifications. L’ostium de l’artère coronaire gauche prend naissance dans le sinus de Valsalva gauche et forme le tronc commun qui se subdivise en 2 branches : (1) l’artère interventriculaire antérieure (IVA) : irrigue la paroi antérieure du

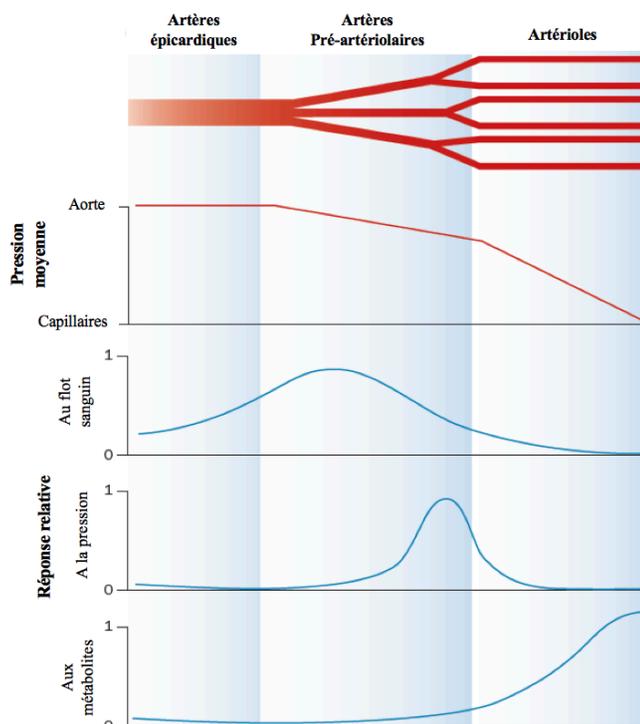
ventricule gauche, l'apex et le septum antérieur et donne naissance à des branches diagonales qui perfusent la paroi antérolatérale; (2) l'artère circonflexe (Cx) : se subdivise en branches marginales qui perfusent la paroi inférolatérale, inférieure et postérieure du ventricule gauche. L'ostium de l'artère coronaire droite prend naissance dans le sinus de Valsalva droit et donne des branches qui irriguent la paroi inférieure du ventricule gauche et le septum inférieur, de même que l'oreillette droite et le ventricule droit. Elle donne également naissance aux branches qui irriguent le nœud sinusal et le nœud auriculoventriculaire [7]. Des variations anatomiques des branches filles et ramifications sont très fréquentes chez l'humain. Selon la nomenclature décrite par *Bypass Angioplasty Revascularization Investigators (BARI)* [8], l'artère coronaire droite est dominante dans approximativement 85% des individus, donnant naissance à l'artère interventriculaire postérieure (IVP) et au moins une branche postéro-latérale. Chez 7% à 8% des individus, la circulation coronarienne est dominée par l'artère coronaire gauche; les artères postéro-latérale, l'IVP et les branches nodale et auriculoventriculaire sont issues de la portion terminale de l'artère circonflexe. Une circulation coronarienne dite équilibrée (i.e. codominance) est également observée chez 7% à 8% des individus, dans laquelle l'artère coronaire droite donne naissance à l'artère IVP et l'artère circonflexe aux branches postéro-latérales [8].



**Figure 4.** Anatomie des artères coronaires.

Adaptée de : <http://drwheat.blogspot.com/2011/08/coronary-circulation.html>

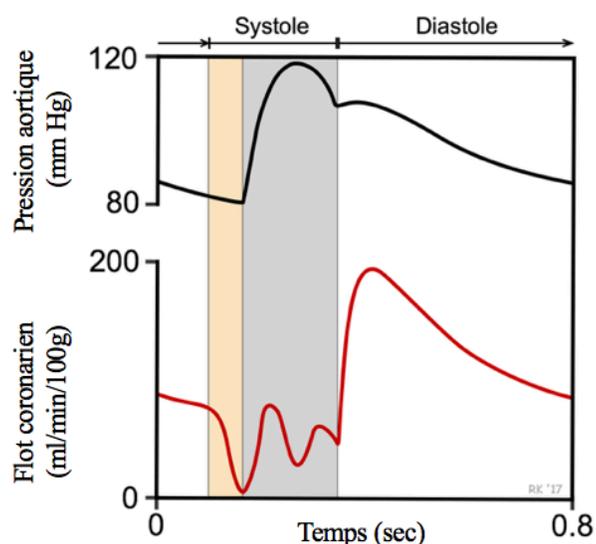
Le réseau artériel coronaire est composé de 3 compartiments différents dotés de fonctions distinctes (Figure 5). Les artères coronaires épiscopardiques saines constituent un système à basse pression, soumis à de faibles résistances [9]. Durant la systole, phase de contraction myocardique, les artères coronaires épiscopardiques se dilatent et augmentent leur contenu sanguin d'environ 25%, alors que les artères intra-myocardiques formant la microcirculation (artérioles, capillaires et veinules) se compriment, favorisant ainsi la perfusion des artères sus-épiscopardiques et l'augmentation du retour veineux coronaire. Durant la diastole, phase de relaxation myocardique, les artères intra-myocardiques s'ouvrent et l'afflux sanguin artériel coronaire augmente suivant un gradient de pression transmural, favorisant la perfusion des vaisseaux sous-endocardiques et, par conséquent, une diminution du flot veineux coronaire (Figure 5) [9, 10].



**Figure 5.** Circulation artérielle coronaire, comprenant les artères épiscopardiques et la microcirculation (artères pré-artériolaires et artérioles), adaptée de [9].

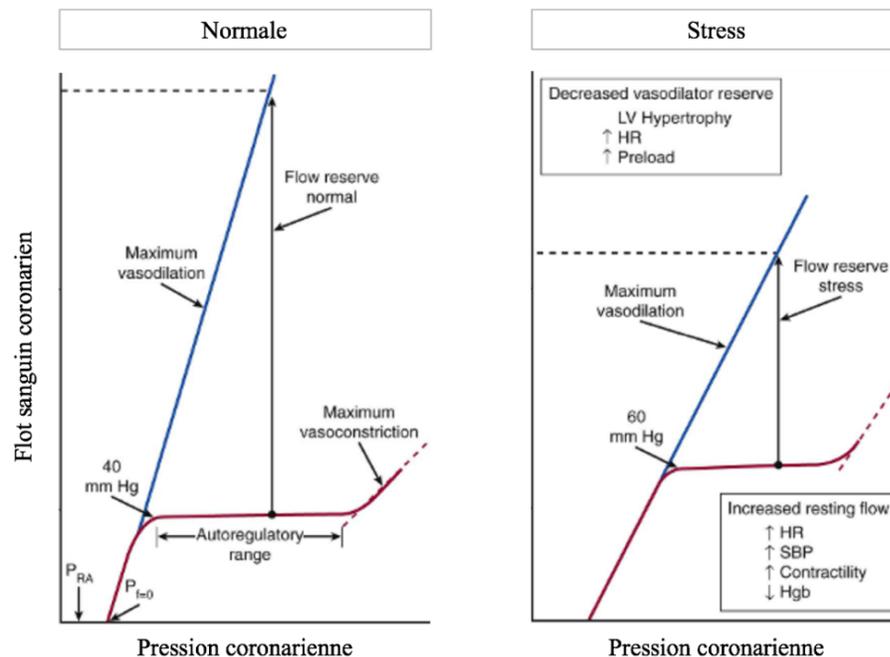
Les petites artères et artérioles de la microcirculation sont le site principal des résistances vasculaires, ayant pour rôle d'assurer la régulation du flot sanguin en réponse

aux changements de la pression de perfusion et/ou du flot sanguin coronaire. Les pré-artérioles proximales, sensibles aux changements de débit/flot, sont le site de régulation métabolique du flot sanguin myocardique et leur tonus est influencé par divers métabolites issus du métabolisme myocardique. Les pré-artérioles distales sont sensibles aux changements de pression intravasculaire; elles assurent un débit sanguin coronaire constant en réponse aux variations de la pression aortique, phénomène appelé *autorégulation* (Figure 7). Lorsque la pression chute en deçà de la limite de l'autorégulation, les pré-artérioles se dilatent en réponse aux stimuli intrinsèques (hypérémie active) et le flot coronaire devient dépendant de la pression artérielle, résultant en la survenue d'ischémie sous-endocardique [10, 11]. La réserve coronarienne, soit la capacité des artères coronaires à augmenter l'afflux de sang en réponse aux vasodilatateurs pharmacologiques, est altérée dans plusieurs conditions : (1) temps de perfusion diastolique plus court (i.e. tachycardie); (2) réduction des vasodilatateurs locaux (i.e. pré-charge augmentée); (3) lors d'un stress myocardique, menant à l'augmentation de la consommation en oxygène ( $O_2$ ) (i.e. augmentation de la pression systolique, fréquence cardiaque, contractilité) et; (4) par réduction des apports en oxygène artériel (i.e. hypoxie, anémie). Ainsi, ces conditions métaboliques mènent à l'apparition d'ischémie sous-endocardique en présence d'artères coronaires saines [11, 12].



**Figure 6.** Perfusion coronarienne durant le cycle cardiaque, adaptée de : <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF001>

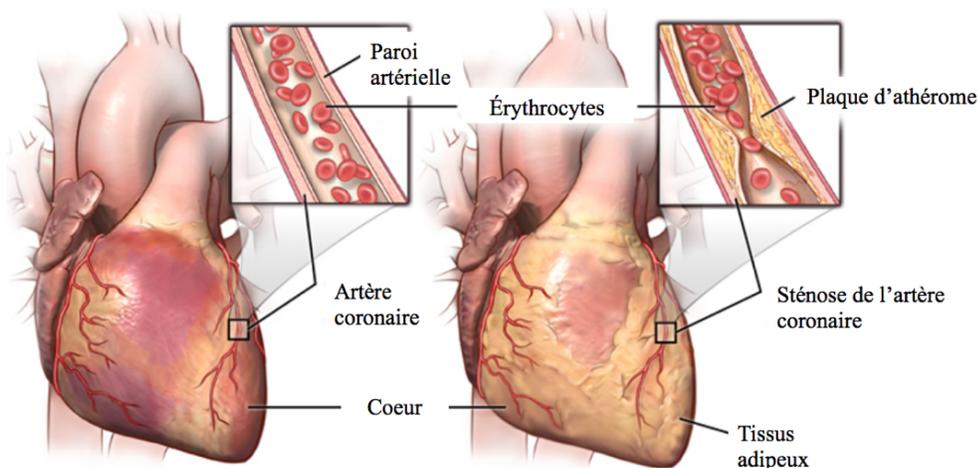
La fonction des artérioles est d'assurer un équilibre entre la demande en  $O_2$  et l'apport sanguin au myocarde. Celles-ci se subdivisent en un réseau dense de capillaires, adjacent aux cardiomyocytes, qui assure la livraison d' $O_2$  aux cellules musculaires cardiaques de même que l'élimination des déchets métaboliques (i.e.  $CO_2$  et  $H^+$ ). Le flot sanguin capillaire s'écoule dans les veinules qui se regroupent ensemble pour former les veines cardiaques, dont le contenu est drainé dans le sinus coronaire situé dans la région postérieure du cœur. Le contenu en sang désoxygéné du sinus coronaire est par la suite drainé dans l'oreillette droite. En plus du flot sanguin coronarien, l'apport en  $O_2$  est directement lié à la pression partielle en oxygène ( $PaO_2$ ), soit le produit de la concentration en hémoglobine et la saturation artérielle en oxygène en addition à la faible quantité d'oxygène dissoute dans le plasma. Les déterminants majeurs de la consommation en oxygène myocardique sont la fréquence cardiaque, la pression artérielle systolique et la contractilité cardiaque [10]. La consommation basale en oxygène du myocarde est de 8-10 mL  $O_2$ /min/100 g [10].



**Figure 7.** Autorégulation du flot sanguin coronarien en conditions basales et en stress métabolique, adaptée de [10].

### 1.3. Pathophysiologie

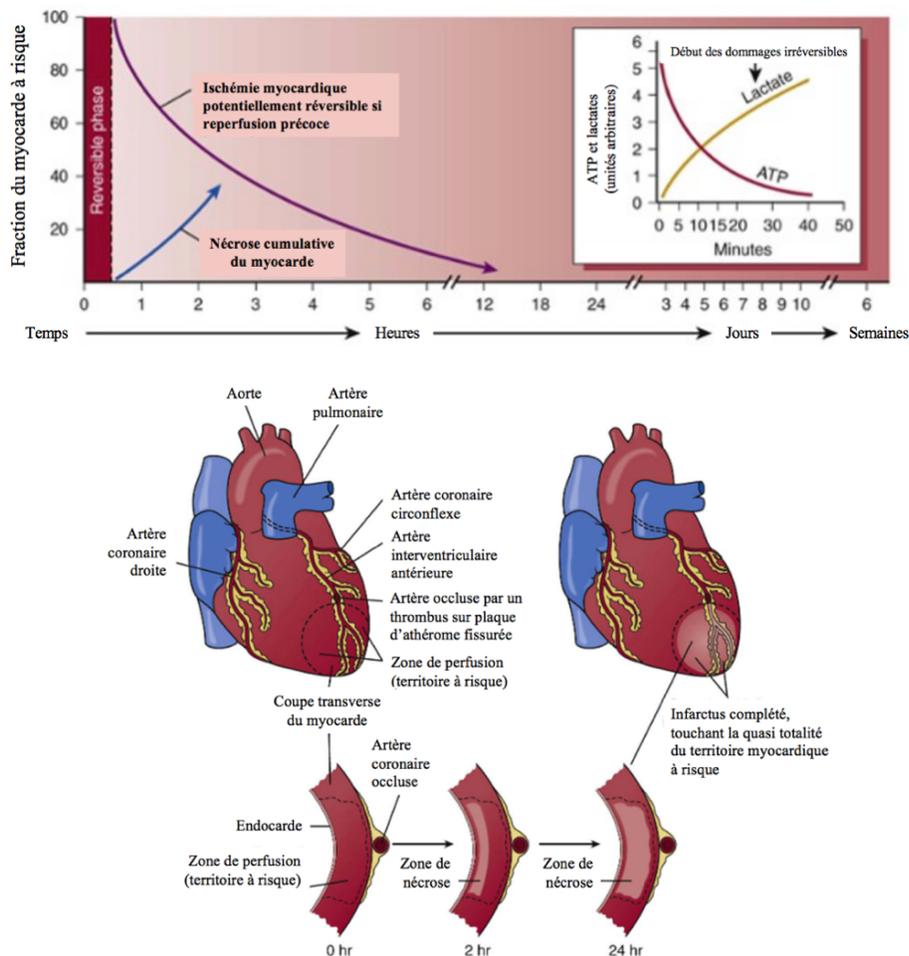
L'athérogenèse se caractérise par le dépôt anormal de lipides et par l'infiltration de leucocytes dans la paroi vasculaire, déclenchant une cascade inflammatoire qui résulte en la formation d'une plaque d'athérome et à l'épaississement de la paroi vasculaire. Ces changements entraînent un rétrécissement du diamètre interne de l'artère, communément appelée sténose, pouvant générer de l'ischémie myocardique par réduction de l'apport sanguin au myocarde (Figure 8).



**Figure 8.** La maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS), adaptée de [https://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/conditions/cardiovascular\\_diseases/coronary\\_heart\\_disease\\_85,P00207](https://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/conditions/cardiovascular_diseases/coronary_heart_disease_85,P00207).

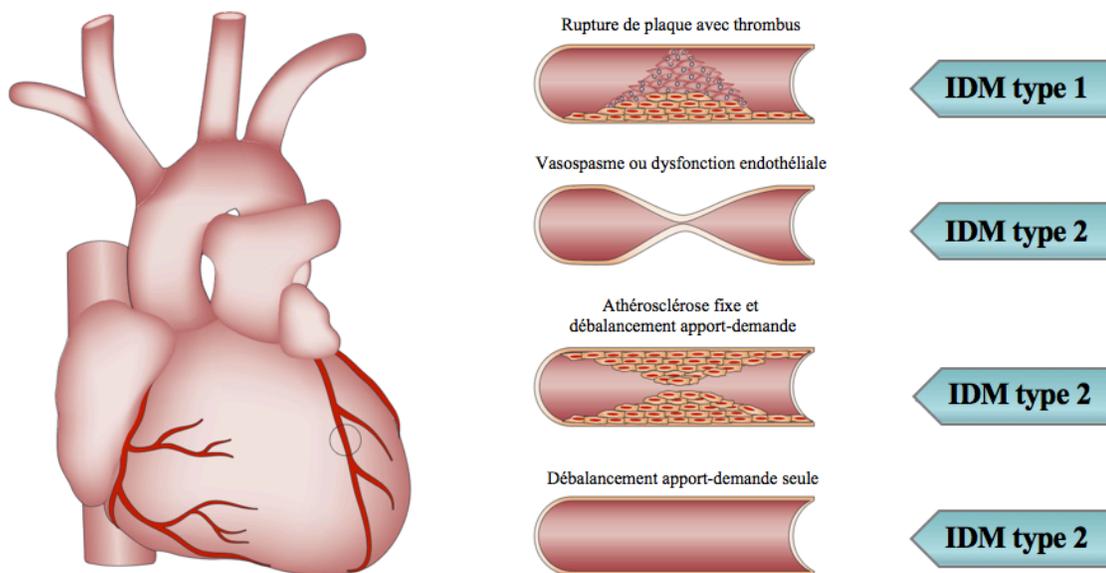
Lorsqu'une sténose coronarienne altère la perfusion d'un territoire myocardique, menant à un déséquilibre entre l'apport et la demande en  $O_2$  du myocarde, les cardiomyocytes deviennent hypoxiques, phénomène généralement associé à la survenue d'angine et autres symptômes cliniques [10, 13]. L'hypoxie tissulaire est associée à la déplétion des niveaux d'adénosine triphosphate (ATP), à l'accumulation de lactate et catabolites, et à la perte de fonction cellulaire normale. *L'angine instable* se définit par la présence d'ischémie myocardique au repos ou à l'effort léger en absence de nécrose des cardiomyocytes. Lorsque l'ischémie myocardique persiste, il y a apparition d'acidose tissulaire, résultant en l'efflux de potassium dans l'espace extracellulaire et à l'altération de

l'intégrité membranaire des cellules. *L'infarctus aigu du myocarde (IDM)* se définit par de l'ischémie myocardique sévère menant à la nécrose des myocytes cardiaques. Une insulte myocardique irréversible survient 20 minutes après l'occlusion aiguë d'une artère coronaire en absence de circulation collatérale significative, avec progression transmurale de l'infarctus après 4 à 6 heures (Figure 9) [10, 14]. Ainsi, il est impératif d'agir rapidement lors de l'occlusion aiguë d'une artère coronaire afin d'éviter la survenue de dommages irréversibles engendrés au myocarde, d'où l'expression populaire dans le milieu médical, « *time is muscle* ». La nécrose myocardique aiguë et l'ischémie myocardique chronique peuvent engendrer l'altération des propriétés mécaniques et électriques cardiaques et ainsi mener au développement d'insuffisance cardiaque et d'arythmies malignes.



**Figure 9.** Schéma temporel des changements biochimiques et structuraux suivant la survenue d'un infarctus du myocarde, adaptée de [10].

Selon la définition universelle de l'infarctus du myocarde [15], l'IDM de type 1 est caractérisé par la rupture, l'érosion ou l'ulcération d'une plaque d'athérosclérose, résultant en la formation d'un thrombus endoluminal dans une ou plusieurs artères coronaires, menant à l'altération du flot sanguin myocardique et/ou à l'embolisation distale et subséquemment à la nécrose myocardique. L'ischémie sous-endocardique peut également être causée par des anomalies de la microcirculation/dysfonction endothéliale, de même que par une diminution de l'apport en O<sub>2</sub> au myocarde (i.e. anémie, hypotension profonde, bradyarythmies, insuffisance respiratoire, spasme coronarien) ou lorsque la demande en O<sub>2</sub> est accrue (i.e. tachyarythmies, urgences hypertensives, sténose sévère de la valve aortique) [10]. La nécrose du myocarde résultant d'une condition autre que l'instabilité d'une plaque d'athérome coronarienne est désignée IDM de type 2 (Figure 10) [15].



**Figure 10.** Différenciation entre l'infarctus du myocarde (IDM) de type 1 et 2 selon d'anatomie de l'artère coronaire, adaptée de [16].

## 1.4. Étiologies

L'athérosclérose coronarienne est la cause la plus fréquente de survenue d'un infarctus du myocarde. Toutefois, d'autres pathologies peuvent altérer la biologie des artères coronaires et mener à l'occlusion aiguë de celles-ci en l'absence de plaque d'athérosclérose (Tableau I).

<b>Maladie coronarienne non-athérosclérotique</b>	
Artérite	Épaississement des coronaires avec maladie métabolique ou maladie proliférative de l'intima
Lupus érythémateux disséminé	Mucopolysaccharidoses
Takayasu	Homocystinurie
Polyartérite noueuse	Maladie de Fabry
Syndrome de Kawasaki	Amyloïdose
Spondylarthrite rhumatoïde	Sclérose intimale juvénile
Spondylarthrite ankylosante	Hyperplasie intimale liée aux stéroïdes ou en période postpartum
Trauma des artères coronaires	Pseudoxanthome élastique
Lacération	Radiation
Thrombose	Rétrécissement du diamètre interne d'une artère coronaire
Radiation	Spasme (angine de Prinzmetal)
Iatrogénique	Dissection aortique
	Dissection coronaire spontanée
<b>Causes emboliques</b>	
Endocardite infectieuse	
Endocardite thrombotique non bactérienne	
Prolapsus mitral	
Thrombus mural de l'oreillette gauche, ventricule gauche ou veines pulmonaires	
Embolie d'une valve prothétique	
Myxome cardiaque	
Secondaire à une circulation extracorporelle ou angiographie coronaire	
Embolie paradoxale	
Fibroélastome de la valve aortique	
Thrombus provenant de cathéters intracardiaques ou guides	
<b>Malformations congénitales</b>	
Anomalie de l'artère coronaire gauche qui origine de l'artère pulmonaire	
Anomalie de l'artère coronaire gauche qui origine du sinus antérieur de Valsalva	
Fistule artério-veineuse coronarienne	
Anévrisme d'une artère coronaire	
<b>Déséquilibre entre la demande et l'apport O<sub>2</sub></b>	
Sténose aortique	
Insuffisance aortique	
Intoxication au monoxyde de carbone	
Thyrotoxicose	
Hypotension artérielle prolongée	
Cardiomyopathie de stress (Takotsubo)	
<b>Causes hématologiques</b>	
Polycythémie vraie	
Thrombocytose	
Coagulation intravasculaire disséminée	
Hypercoagulabilité, thrombose, purpura thrombocytopénique	
<b>Autres</b>	
Abus de cocaïne	
Contusion cardiaque	
Complications de l'angiographie coronarienne	
Infarctus du myocarde sur artères coronaires normales	

**Tableau I.** Causes de l'infarctus du myocarde sans maladie coronarienne athérosclérotique, adapté de [17].

## 1.5. Facteurs de risque

Le concept de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires fut initialement évoqué lors de la publication de l'étude longitudinale de Framingham en 1957 [18]. Cette étude démontrait la relation épidémiologique entre le tabagisme, les niveaux de pression artérielle et de cholestérol sérique et l'incidence de la MCAS. Ces découvertes ont révolutionné la pratique médicale et changé les dogmes de l'époque, où la MCAS était jusqu'alors considérée comme un processus normal du vieillissement. Ainsi, la modification des habitudes de vie non sanitaires fut proposée comme méthode potentielle de prévention de la survenue de maladies cardiovasculaires.

En somme, l'étude de Framingham a démontré que l'âge avancé, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle et l'obésité augmentent le risque de survenue de maladies cardiovasculaires. D'autres facteurs de risque majeurs furent subséquemment identifiés tels que le diabète mellitus, la sédentarité, le sexe et les conditions psychosociales [19]. Le développement de maladies cardiovasculaires semble relié à l'interdépendance de ces multiples facteurs de risque en présence chez un individu plutôt qu'à la présence d'une seule comorbidité isolée. Parmi les facteurs de risque ci-haut mentionnés, certains sont dits modifiables, c'est-à-dire qu'ils peuvent être modulés suivant l'adoption de changements des habitudes de vie et par l'initiation de traitements pharmacologiques, alors que d'autres sont dits non modifiables (Tableau II).

<b>Facteurs de risque modifiables</b>	<b>Facteurs de risque non modifiables</b>
Hypertension artérielle	Âge
Hypercholestérolémie	Sexe
Diabète mellitus	Race
Obésité ou syndrome métabolique	Hérédité
Insuffisance rénale chronique	
Tabagisme actif ou ancien	
Inactivité physique	
Diète	
Dépression	

**Tableau II.** Facteurs de risque modifiables et non modifiables des maladies cardiovasculaires [19].

Le score de risque de Framingham, subséquentement élaboré par les investigateurs de l'étude Framingham [20], est un algorithme permettant d'estimer le risque cardiovasculaire à 10 ans d'un individu selon différents critères : l'âge, le profil lipidique, les niveaux de pression artérielle, la présence d'un diabète mellitus et le statut tabagique. Ce système de score du risque CV permet non seulement d'estimer la probabilité d'un individu de développer une maladie CV, mais également d'identifier ceux qui bénéficieront davantage de la prévention primaire. Ainsi, la possibilité d'identifier les hommes et femmes à risque accru d'événements cardiovasculaires futures s'avère utile afin de guider les cliniciens dans la prise en charge des patients, notamment sur l'éducation thérapeutique, la modification des habitudes de vie et l'instauration de traitements pharmacologiques. Plusieurs scores du risque CV sont disponibles gratuitement sur internet, rendant leur utilisation très simple et rapide pour les cliniciens [21].

## **1.6. Présentation clinique**

L'angine chronique stable est la manifestation clinique initiale de la maladie coronarienne chez approximativement 50% des patients, générée par l'obstruction d'au moins une artère coronaire épiscopordique secondaire à une plaque d'athérosclérose [22]. L'angine de poitrine est causée par le débalancement entre la demande et l'apport en oxygène au myocarde, résultant en la survenue d'ischémie myocardique. La maladie coronarienne peut être asymptomatique ou se présenter sous forme de complications telles que le syndrome coronarien aigu (SCA), incluant l'angine instable et l'infarctus aigu du myocarde, l'insuffisance cardiaque congestive, les arythmies cardiaques ou la mort subite.

### **1.6.1. Histoire clinique**

L'angine de poitrine est caractérisée par une douleur rétrosternale, une sensation d'oppression ou lourdeur au niveau du thorax pouvant irradier à la mâchoire, aux épaules, dans le dos ou au niveau des bras et persiste typiquement entre 2 à 10 minutes. Les symptômes surviennent généralement à l'effort, lors d'un stress émotionnel, au froid ou

en postprandial et disparaissent après 5 minutes de repos ou suivant la prise de nitroglycérine [23]. Ces critères sont issus de la classification de Diamond [24] permettant de définir si la douleur thoracique est typique, atypique ou non cardiaque suivant la présence des 3 critères ci-haut mentionnés, de 2 ou moins de 2 critères. Le degré de sévérité de l'angine de poitrine peut être évaluée au moyen des critères de gradation de l'angine de poitrine publiée par la Société Canadienne de Cardiologie (SCC) (Tableau III) [25]. Une douleur épigastrique, de la dyspnée, de la fatigue ou une lipothymie peuvent être des symptômes prédominants évocateurs d'une MCAS sous-jacente et sont considérés comme des *équivalents angineux* chez les patients à risque [5, 23].

Classification modifiée de la Société Canadienne de Cardiologie (SCC) du degré de sévérité de l'angine de poitrine	
Classe I	Angine survenant suivant un effort physique intense ou rapide ou prolongé
Classe II	Angine survenant suivant un effort modéré (marche > 2 blocs sur un terrain incliné ou monter plus d'un pallier d'escalier à vitesse normale; marcher ou monter les escalier rapidement, dans le froid ou le vent, sous un stress émotionnel ou durant les premières heures du matin après le réveil)
Classe III	Angine survenant suivant un effort léger (marche 1 ou 2 blocs sur un terrain incliné ou monter un pallier d'escalier à un rythme normal et dans des conditions normales)
Classe IV	Angine survenant à n'importe quel niveau d'effort et pouvant survenir au repos

**Tableau III.** Classification modifiée de la Société Canadienne de Cardiologie du degré de sévérité de l'angine pectorale [23].

Une douleur thoracique dite « atypique », non évocatrice d'ischémie myocardique, diminue la probabilité que les symptômes soient liés à la survenue d'un syndrome coronarien aigu. Les lignes directrices de *l'American College of Cardiology (ACC) and American Heart Association (AHA)* évoquent le type et les caractéristiques d'une douleur dite non cardiaques [26] :

- Douleur pleurétique (douleur aiguë majorée à l'inspiration ou à la toux)
- Inconfort localisé principalement dans la région abdominale moyenne ou basse
- Douleur pouvant être localisée avec le bout du doigt, particulièrement à l'apex du ventricule gauche
- Douleur reproductible au mouvement ou à la palpation de la cage thoracique ou des bras

- Douleur constante qui persiste depuis plusieurs heures
- Épisodes brefs de douleurs durant quelques secondes ou moins
- Douleur irradiant dans les membres inférieurs

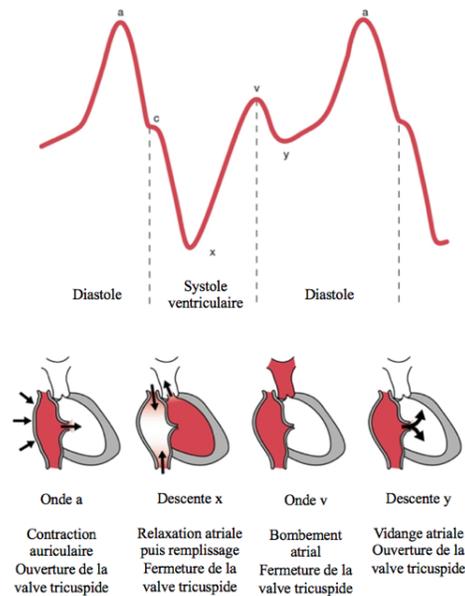
L'angine instable et le syndrome coronarien aigu surviennent lors d'une occlusion partielle ou totale d'une artère coronaire épicaudique, nécessitant une prise en charge urgente. L'angine dite instable se caractérise par un schème accéléré/crescendo récent de douleurs thoraciques et/ou survenant au repos, alors que l'angor associé à l'infarctus du myocarde se manifeste par une douleur soudaine et prolongée, d'une durée supérieure à 20-30 minutes, d'intensité sévère, survenant au repos et n'étant que partiellement ou non soulagée par la prise de nitroglycérine, et généralement associée à de la dyspnée, faiblesse, diaphorèse, nausées et vomissements [23].

### 1.6.2. Examen physique

L'examen cardiovasculaire des patients présentant des douleurs thoraciques est fréquemment sans particularité [5, 26]. Il est toutefois essentiel d'identifier les causes potentielles pouvant précipiter la survenue d'ischémie myocardique telles que l'hypertension artérielle non contrôlée, la présence de comorbidités importantes (i.e. maladie pulmonaire obstructive chronique) et les signes de complications hémodynamiques (i.e. insuffisance cardiaque congestive, insuffisance mitrale aiguë, hypotension) et/ou d'instabilité électrique nécessitant une prise en charge immédiate [23, 26].

1. L'inspection : L'évaluation clinique débute par l'apparence générale puisque de nombreux indices sur l'état cardiovasculaire d'un patient peuvent être détectés par une simple inspection visuelle. La coloration de la peau (i.e. pâleur, cyanose, diaphorèse) et le niveau d'état de conscience d'un individu peuvent tous être des signes révélateurs d'une altération de la perfusion systémique. La prise des signes vitaux, dont la pression artérielle, la fréquence cardiaque, la saturation en oxygène et la fréquence respiratoire, peut révéler un état

d'instabilité hémodynamique et ainsi influencer la rapidité de prise en charge clinique. La pression veineuse centrale (PVC) peut être estimée par l'évaluation de la pression veineuse jugulaire (PVJ), reflétant la pression dans l'oreillette droite du cœur. L'évaluation des différentes ondes (montées et descentes) de la veine jugulaire interne droite permet d'identifier les différentes étapes du cycle cardiaque (Figure 11). Une PVJ élevée se définit par l'onde jugulaire ayant une hauteur de plus de 4 cm au-dessus de l'angle de Louis, soit à plus de 9 cm au-dessus de l'oreillette droite, ce qui indique fréquemment une insuffisance cardiaque droite. La prédominance d'une montée ou d'une descente d'une onde jugulaire est associée à différentes affections cardiovasculaires, dont certaines pathologies valvulaires, troubles du rythme, la péricardite constrictive ou tamponnade cardiaque [27].

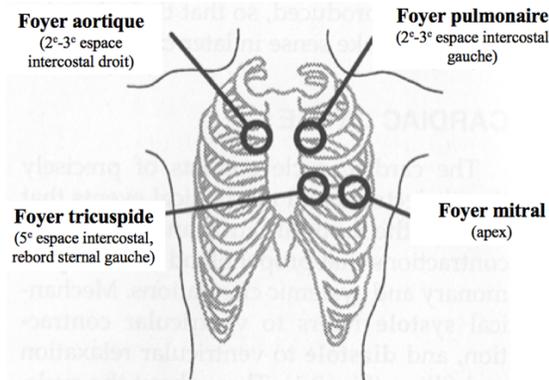


**Figure 11.** Représentation schématisée des ondes de la pression veineuse jugulaire (PVJ), adaptée de [27].

2. Palpation : L'examen clinique doit inclure la palpation de tous les pouls artériels (carotidien, huméral, radial, ulnaire, fémoral, poplité, pédieux et tibial postérieur). L'évaluation du caractère, de l'amplitude et de la symétrie de ceux-ci peuvent être indicateurs de pathologies cardiaques sous-jacentes, dont une

coarctation de l'aorte ou de l'insuffisance aortique. La palpation de la peau permet d'identifier la présence d'œdème des membres inférieurs et de rechercher le signe du godet chez les patients avec insuffisance cardiaque congestive. A l'examen du thorax, la localisation, l'amplitude, l'intensité et la durée du choc apexien peuvent être évocateurs d'une pathologie valvulaire, d'hypertrophie ventriculaire droite (soulèvement parasternal droit) ou dilatation du ventricule gauche (latéralisation du choc apexien) [28].

3. Percussion : La matité de l'abdomen permet d'identifier la présence d'ascite, de même qu'une hépatomégalie en présence d'insuffisance cardiaque droite.
4. L'auscultation : L'auscultation cardiaque des 4 foyers consiste à rechercher la présence des 2 premiers bruits (B1 et B2), de même que des bruits pathologiques (Figure 12). La présence d'un troisième bruit cardiaque (B3) perçu après le deuxième bruit peut être dû à la dysfonction transitoire du ventricule gauche ou d'un souffle de régurgitation mitrale généré par la dysfonction d'un muscle papillaire secondaire à de l'ischémie myocardique. En présence de dysfonction diastolique ou de cardiomyopathie hypertensive, un quatrième bruit (B4) peut être entendu juste avant le B1. Un souffle cardiaque peut indiquer la présence d'une pathologie valvulaire, d'une anomalie congénitale ou d'une complication mécanique d'un infarctus du myocarde. Afin de différencier ces pathologies et d'établir un diagnostic plausible, il est essentiel d'identifier à quel moment du cycle cardiaque le souffle est entendu, de même que sa localisation, sa durée, son intensité, sa forme, sa tonalité, son irradiation et sa variation avec les manœuvres modifiant la pré-charge et/ou la post-charge. La présence de râles crépitants aux bases pulmonaires est un signe de congestion cardiaque gauche. L'examen des vaisseaux périphériques est essentiel dans la mise en évidence de maladie athérosclérotique non coronarienne (i.e. diminution des pouls périphériques, souffle carotidien ou des artères rénales, anévrisme de l'aorte abdominale) [23, 26].



**Figure 12.** Quatre foyers de l'auscultation cardiaque, adaptée de [29].

L'examen physique permet également d'identifier les causes non-cardiaques de douleurs thoraciques (i.e. dissection aortique, embolie pulmonaire, myopéricardite) ou pathologies extracardiaques (i.e. pneumothorax, pneumonie, maladie musculosquelettique, spasme œsophagien) nécessitant des examens complémentaires et une prise en charge spécifique [5, 26].

### 1.6.3. Probabilité pré-test de maladie coronarienne athérosclérotique

Chez les patients avec symptômes suggestifs de maladie coronarienne athérosclérotique stable, la probabilité d'avoir une coronaropathie obstructive sous-jacente est estimée selon l'histoire clinique et les facteurs de risque en présence. Un électrocardiogramme (ECG) de repos à 12 dérivations doit être réalisé chez tous les patients symptomatiques. Bien qu'il soit normal chez près de 50% des patients avec angine stable, dont ceux avec maladie coronarienne sévère et fraction d'éjection préservée du ventricule gauche, l'ECG seul ne peut toutefois exclure le diagnostic de MCAS [5, 30, 31]. Lors d'un épisode d'angine de poitrine, 50% des patients ayant un ECG de repos normal développent des changements électrocardiographiques, dont le plus fréquemment observé est le sous-décalage transitoire du segment ST [5, 30].

L'apport d'un test diagnostique est maximal chez les patients ayant une probabilité prétest intermédiaire de maladie coronarienne puisque les résultats de ces examens non invasifs, qu'ils soient positifs ou négatifs, auront un impact majeur sur la probabilité post-test (Tableau IV) et sur la prise en charge clinique subséquente. Selon les recommandations de la Société Canadienne de Cardiologie (SCC), il est suggéré de procéder à des tests non invasifs pour des fins diagnostiques et pronostiques de MCAS chez : (1) tous individus âgés de  $\geq 30$  ans avec 2 de 3 critères d'angine; (2) hommes âgés de  $\geq 40$  ans et femmes âgées de  $\geq 60$  ans avec 1 de 3 critères d'angine et; (3) hommes âgés de  $< 40$  ans et femmes âgées de  $< 60$  ans avec 1 de 3 critères d'angine et facteurs de risque CV [30]. Il est fortement déconseillé de procéder à des examens non invasifs chez des patients asymptomatiques, excepté en présence d'ischémie myocardique soupçonnée sur un ECG de repos réalisé en ambulatoire ou en présence de calcifications coronariennes sévères détectées sur une tomodensitométrie (TDM) axiale du thorax [32].

Âge (an)	Douleur thoracique non angineuse		Angor atypique		Angor typique	
	Homme	Femme	Homme	Femme	Homme	Femme
30-39	4	2	34	12	76	26
40-49	13	3	51	22	87	55
50-59	20	7	65	31	93	73
60-69	27	14	72	51	94	86

**Tableau IV.** Probabilité pré-test de MCAS chez les patients symptomatiques selon le sexe et l'âge, adaptée de [32].

## 1.7. Investigations

La valeur prédictive d'un test diagnostique est directement liée à la sensibilité et la spécificité du test ainsi qu'à la probabilité prétest de l'existence de la maladie (théorème de Bayes). Le diagnostic de MCAS sous-jacente peut être établi en provoquant la survenue d'ischémie myocardique (reflétée par des modifications anormales à l'ECG, nouvelles anomalies régionales de la contractilité ou déficit de perfusion myocardique) ou lors

d'anomalies sous-jacentes de contractilité du ventricule gauche au repos, en particulier lorsqu'associés à un déficit de perfusion, ou par détection d'une sténose des artères coronaires (Tableau V).

Examens	Sensibilité	Spécificité
Épreuve d'effort	0.68	0.77
SPECT à l'effort	0.84	0.78
SPECT avec adénosine	0.89	0.75
Échocardiographie à l'effort	0.79	0.84
Tomodensitométrie par cohérence angiographique	0.96	0.82
Tomographie par émission de positrons	0.90	0.88
IRM cardiaque (perfusion)	0.91	0.81

SPECT : tomodensitométrie par émission de photons; IRM : imagerie par résonance magnétique

**Tableau V.** Sensibilité et spécificité des examens non invasifs à l'effort pour le diagnostic de la MCAS, adapté de [30].

Bien qu'il soit controversé de privilégier les modalités d'imagerie non invasives à l'épreuve d'effort pour l'investigation initiale de la MCAS, celles-ci demeurent le premier choix chez les patients avec anomalies électrocardiographiques au repos limitant l'interprétation des tracés à l'effort de même que chez ceux sous traitement à la digoxine (i.e. imprégnation digitalique). Les modalités d'imagerie cardiaque peuvent apporter des informations supplémentaires concernant l'étendue, la sévérité et la localisation de l'ischémie myocardique, permettent d'évaluer la présence de déficits fixes irréversibles, d'estimer la viabilité d'un territoire myocardique, la fonction ventriculaire gauche (FeVG) et l'impact fonctionnel d'une sténose coronarienne chez les patients ayant subi une angioplastie coronarienne élective. La stratification du risque selon les résultats obtenus par modalités d'investigation non invasives à l'effort permet d'évaluer les patients qui bénéficieront d'une coronarographie diagnostique (Tableau VI).

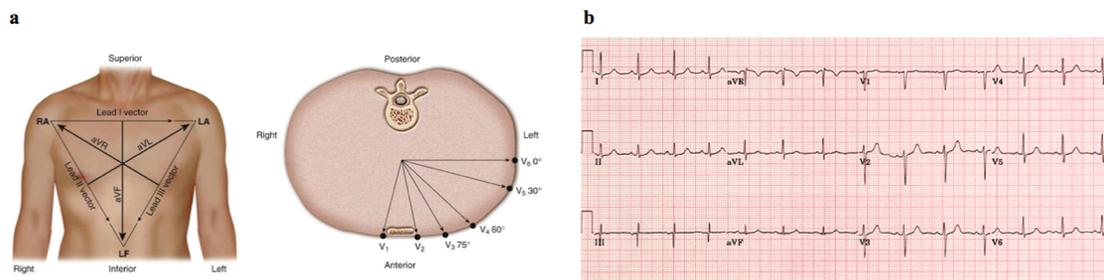
Bien que les cliniciens aient fréquemment recours à des modalités d’investigation non invasives ou invasives dans l’évaluation initiale des patients présentant de l’angine, l’histoire et l’examen clinique s’avèrent la pierre angulaire pour estimer la sévérité de la maladie coronarienne athérosclérotique. Pryor et al. [33] ont identifié 11 caractéristiques cliniques spécifiques – angine typique, antécédent d’infarctus du myocarde, l’âge, le sexe, la durée des symptômes, l’hypertension, le diabète, l’hyperlipidémie, le tabagisme, la présence d’un souffle carotidien et la fréquence des douleurs thoraciques – et ont développé un modèle d’estimation de la probabilité de MCAS sévère chez un patient donné. Par la suite, un modèle simplifié de score du risque cardiovasculaire, basé sur 5 caractéristiques dont le sexe masculin, l’angine typique, l’évidence d’antécédent d’infarctus du myocarde basé sur la clinique ou l’ECG, le diabète et l’insulinothérapie, fut subséquemment développé afin de prédire la présence de MCAS sévère en fonction de l’âge [34]

<b>Risque élevé (&gt;3% mortalité annuelle)</b>
Dysfonction VG sévère au repos (FeVG<35%)
Score de Duke élevé ( $\leq -11$ )
Dysfonction VG sévère à l’effort (FeVG<35%)
Déficit de perfusion très étendu induit par l’effort (surtout si antérieur)
Déficits de perfusion multiples et d’étendue modérée induits par l’effort
Déficit fixe de perfusion très étendu et avec dilatation VG ou captation pulmonaire (thallium-201)
Déficit de perfusion d’étendue modérée induit par l’effort avec dilatation VG ou captation pulmonaire (thallium-201)
Anomalies régionales de contractilité à l’échocardiographie (>2 segments) induites par faibles doses de dobutamine ou a fréquence cardiaque lente (120 battements/min)
Échocardiographie à l’effort avec mise en évidence d’ischémie myocardique étendue
<b>Risque intermédiaire (1-3% mortalité annuelle)</b>
Dysfonction VG légère à modérée au repos (FeVG 35%-49%)
Score de Duke intermédiaire (-10 à 4)
Déficit modéré de perfusion du myocarde induit à l’effort sans dilatation VG ou captation pulmonaire
Anomalies régionales de contractilité à l’échocardiographie d’effort induites uniquement à hautes doses de dobutamine et limitées ( $\leq 2$ segments)
<b>Faible risque (&lt;1% mortalité annuelle)</b>
Score de Duke faible ( $\geq 5$ )
Perfusion myocardique normale ou déficit léger au repos ou induit à l’effort
Contractilité myocardique normale à l’échocardiographie d’effort
FeVG : fraction d’éjection du ventricule gauche; VG : ventricule gauche

**Tableau VI.** Stratification du risque CV en fonction des modalités d’investigation non invasives, adapté de [5, 32].

### 1.7.1. Électrocardiogramme (ECG)

L'ECG à 12 dérivations fournit des informations essentielles pour le diagnostic et le pronostic d'un patient se présentant avec de l'angine de poitrine et doit être réalisé systématiquement lors d'un bilan cardiovasculaire et dans les 10 minutes suivant la présentation d'un patient en douleur thoracique itérative en salle d'urgence (Figure 13). De nouveaux changements persistants ou transitoires du segment ST ( $\geq 0.05$  mV) survenant lors d'épisodes d'angor de repos et/ou disparaissant avec les symptômes sont fortement suggestifs d'ischémie myocardique aiguë [5, 23, 30]. La présence d'ondes Q indique un infarctus du myocarde ancien et ainsi suggère une maladie coronarienne obstructive sous-jacente. Divers troubles de conduction, dont un bloc de branche gauche complet (BBG) et un hémibloc antérieur gauche (HBAG), peuvent être présents chez les patients avec angor stable et sont fréquemment associés à une dysfonction ventriculaire gauche, reflétant la présence d'une maladie coronarienne pluritronculaire ou d'un dommage myocardique ancien [5]. Sachant que près d'un tiers des patients en syndrome coronarien aigu sans élévation du segment ST peuvent avoir un ECG normal lors de la présentation initiale en salle d'urgence, il faut rechercher la présence de sous-décalages transitoires du segment ST, de même qu'un sus-décalage du segment ST ou changements au niveau des ondes T [35, 36]. Dans les cas d'une occlusion de l'artère circonflexe ou d'un infarctus du ventricule droit, il est nécessaire d'effectuer un ECG à 15 dérivations en ajoutant des dérivations latérales ( $V_7$ - $V_9$ ) et droites ( $V_{3R}$  et  $V_{4R}$ ), respectivement, afin de procéder au diagnostic et d'assurer la prise en charge adéquate [37].



**Figure 13.** Représentation des axes électriques du cœur : (a) six dérivations frontales (DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF) et 6 dérivations précordiales ( $V_1$ - $V_6$ ), traduisant (b) l'activité électrique du cœur sur un ECG à 12 dérivations. Adaptée de [23] et [https://meds.queensu.ca/central/assets/modules/ts-ecg/normal\\_ecg.html](https://meds.queensu.ca/central/assets/modules/ts-ecg/normal_ecg.html)

### 1.7.2. Épreuve d'effort

Étant très répandu, simple, fiable, à faible coût et sécuritaire, l'ECG à 12 dérivations réalisé en continu pendant l'effort avec monitoring de la pression artérielle est fréquemment utilisé dans l'évaluation initiale d'un patient pouvant s'exercer et dont l'ECG de repos est normal. Cet examen est le plus souvent réalisé sur un ergocycle ou sur un tapis roulant avec différents paliers d'exercice de 3 minutes à puissance constante. Afin d'être valide, l'épreuve d'effort doit être menée jusqu'à un minimum de 85% de la fréquence cardiaque maximale (fréquence cardiaque maximale théorique = 220 – âge). Ainsi, cet examen devrait être réalisé 48 heures suivant l'arrêt des traitements anti-angineux, dont les bêtabloquants, afin d'obtenir le maximum d'informations diagnostiques [5, 23, 30]. Les principales limitations de l'épreuve d'effort sont l'incapacité du patient à effectuer un effort suffisant et la présence d'anomalies à l'ECG de repos (sous-décalage du segment ST de plus de 1 mm, pré-excitation ventriculaire, BBG, rythme ventriculaire électro-entraîné et imprégnation digitalique), rendant l'interprétation de l'examen impossible sur le plan électrique [5, 38]. L'effort physique peut être évalué en équivalent métabolique (MET), ce qui représente la quantité d'O<sub>2</sub> consommé au repos en position assise; 1 MET est équivalent à 3.5 mL/kg/min O<sub>2</sub>. Le nombre de METs associés à une activité physique est estimé en calculant la VO<sub>2</sub> en mL O<sub>2</sub>/kg/min (consommation en oxygène) divisée par 3.5 mL/kg/min [23, 30].

L'épreuve d'effort est indiquée en première intention pour le diagnostic de maladie coronarienne chez un individu présentant des symptômes d'angor et une probabilité pré-test intermédiaire. Toutefois, cet examen permet également d'évaluer la symptomatologie des patients, la présence d'arythmie à l'effort, la capacité fonctionnelle et l'adaptation tensionnelle et chronotrope per-effort. Une épreuve d'effort est jugée positive sur le plan électrique en présence d'un sous-décalage du segment ST rectiligne ou en pente descendante >1 mm ou en présence d'un sus-décalage du segment ST [23]. Il est possible d'estimer le risque d'ischémie myocardique en calculant le score de Duke à partir de la formule suivante :

$$\text{Score de Duke} = \text{temps de l'effort physique (min)} - (5 \times \text{dépression maximale du segment ST (mm)}) - (4 \times \text{index angineux})$$

L'index angineux s'associe à une valeur de 0 en absence de douleur, 1 en présence d'angine typique à l'effort, et 2 en présence d'angine nécessitant l'arrêt de l'effort. Un score de Duke  $\geq 5$  indique un faible risque d'événements cardiovasculaires, dont la probabilité de survie à 5 ans est estimée à 99%. Ainsi, il n'est pas nécessaire de procéder à des investigations supplémentaires auprès de cette population. A l'opposé, un score  $\leq -11$  est associé à un risque élevé d'événements cardiovasculaires (72% de survie à 5 ans) et nécessite une exploration invasive des artères coronaires par coronarographie. La population à risque intermédiaire de MCAS, qui se définit par un score de Duke entre 4 et  $-10$ , requiert des investigations cardiovasculaires supplémentaires, soit par évaluation de la perfusion myocardique ou par coronarographie diagnostique selon la probabilité pré-test [23, 39, 40]. D'autres critères de sévérité à l'épreuve d'effort suggèrent la présence d'une maladie coronarienne sévère : (1) sous-décalage du segment ST  $\geq 2$  mm, débutant à  $< 5$  METS, impliquant  $\geq 5$  dérivations et persistant  $\geq 5$  min durant le repos; (2) absence d'augmentation de la pression artérielle systolique  $\geq 120$  mm Hg ou chute de celle-ci de  $\geq 10$  mm Hg durant l'effort; (3) symptômes survenant à  $< 5$  METS; (4) sus-décalage du segment ST; et (5) tachycardie ventriculaire soutenue ( $> 30$  sec) ou symptomatique [39]. Autres que les anomalies électrocardiographiques de repos, certaines conditions aiguës représentent des contre-indications au test d'effort (i.e. SCA aigu ou récent, angor instable, hypertension artérielle sévère et non contrôlée, sténose aortique sévère, cardiomyopathie hypertrophique, décompensation cardiaque aiguë, endocardite aiguë, péricardite, myocardite, thrombose veineuse profonde ou embolie pulmonaire récente) [40].

### 1.7.3. Biomarqueurs cardiaques

Les biomarqueurs cardiaques sont complémentaires à l'évaluation clinique initiale et à l'ECG 12 dérivations dans le diagnostic, la stratification du risque et le traitement des patients avec suspicion d'un SCA (Figure 14). La nécrose myocardique altère l'intégrité de la membrane plasmique des cardiomyocytes, les sarcolemmes, libérant des macromolécules intracellulaires (biomarqueurs cardiaques sériques) dans l'espace

interstitiel cardiaque, puis dans le système microvasculaire et lymphatique de la zone infarctée. Ces macromolécules atteignent la circulation périphérique et peuvent être détectées et quantifiées chez les patients avec présentation clinique suggestive d'ischémie myocardique [37, 41]. Les troponines cardiaques (cTn) sont des marqueurs plus sensibles et spécifiques d'un dommage des cardiomyocytes que la créatine kinase (CK), l'isoenzyme MB (CK-MB) et la myoglobine et sont maintenant considérés comme le biomarqueur sérologique de choix pour le diagnostic, la stratification du risque et la prise en charge rapide d'un IDM [41-43].

	Likelihood of myocardial infarction (MI)					
	LOW				HIGH	
I. Clinical setting Symptoms and vital signs						
II. Electro-cardiogram (ECG)	Normal ECG	ST depression (mild)	ST depression	ST depression	ST elevation	
III. Troponin level at 0h		-	-/+	+	++	+++
IV. Troponin change (within 1, 2 or 3h)		-	-/+	+	++	If any of the above, consider direct rule-in
Differential diagnosis	Noncardiac		Unstable angina	Other cardiac	NSTEMI	STEMI

ECG : électrocardiogramme; NSTEMI : infarctus du myocarde sans élévation du segment ST; STEMI : infarctus du myocarde avec élévation du segment ST.

**Figure 14.** Évaluation initiale des patients avec suspicion d'un syndrome coronarien aigu (SCA) [44].

L'avancement des technologies a mené au raffinement et à l'étalonnage de nouveaux tests de détection des troponines de haute sensibilité (hs-cTn) afin de pallier le manque de précision des précédents tests sérologiques, permettant ainsi d'avoir une valeur prédictive négative (VPN) plus élevée pour l'exclusion du diagnostic d'IDM [45]. En présence d'ischémie myocardique, il y a une augmentation dynamique et rapide des troponines cardiaques suivant la survenue des symptômes et celles-ci demeurent élevées

pendant plusieurs jours [46]. La sensibilité analytique et la précision des dosages de troponines de nouvelles générations hypersensibles – hs-cTn – permettent de quantifier le dommage myocardique (>99<sup>e</sup> percentile de la population générale) et ainsi d'établir un diagnostic plus précoce et plus rapide de l'IDM en salle d'urgence, ce qui accélère la prise de décision clinique et l'efficacité des cliniciens [37, 46, 47]. Plusieurs études ont démontré qu'une insulte myocardique est fréquemment diagnostiquée en clinique et est associée à un pronostic défavorable [49, 50]. Bien que la survenue d'une lésion myocardique soit un prérequis au diagnostic d'IDM, elle peut être associée à d'autres conditions cardiaques et non cardiaques telles que la myocardite et l'insuffisance rénale [50, 51]. Ainsi, la 4<sup>e</sup> définition universelle de l'infarctus du myocarde fut récemment publiée par le *Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force* [52], introduisant comme nouveau concept le dommage myocardique, se définissant par l'élévation du niveau sérique des troponines cardiaques, dont  $\geq 1$  valeur au-dessus du 99<sup>e</sup> percentile de la population générale, avec une augmentation et/ou une chute des valeurs de cTn lors d'une insulte myocardique aiguë. L'infarctus du myocarde est défini comme une insulte myocardique aiguë avec : (1) évidence clinique d'ischémie myocardique; (2) détection d'une augmentation et/ou chute des valeurs de cTn dont  $\geq 1$  valeur au-dessus du 99<sup>e</sup> percentile de la population générale; et (3) présence d'au moins un élément suivant : symptômes suggestifs d'ischémie myocardique, nouvelles modifications ischémiques à l'ECG, apparition d'ondes Q pathologiques, perte récente de viabilité myocardique ou anomalies régionales de contractilité corrélant à une étiologie ischémique, présence d'un thrombus coronaire à l'angiographie ou à l'autopsie [52].

#### 1.7.4. Modalités d'imagerie non invasives

L'imagerie cardiaque non invasive englobe plusieurs modalités permettant d'obtenir des images renseignant sur la structure et la fonction cardiaque. Ces techniques sont simples à réaliser, sécuritaires et permettent de diagnostiquer plusieurs pathologies cardiaques, allant de la plaque d'athérome dans les artères coronaires irriguant le muscle cardiaque (MCAS) aux anomalies du myocarde ou des valves cardiaques affectant la

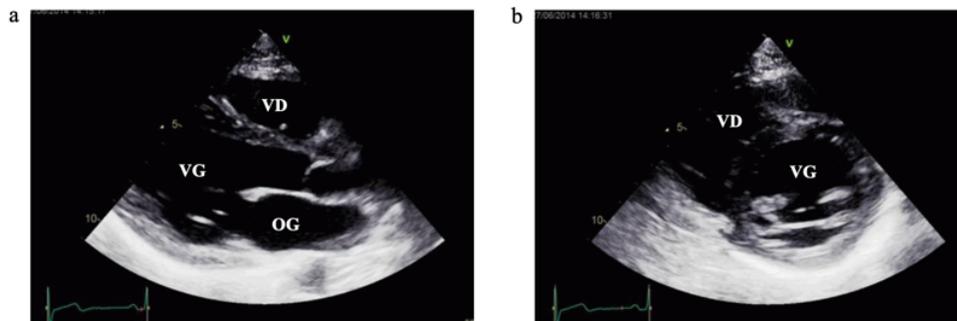
fonction de pompe du cœur. La modalité d'imagerie cardiaque à choisir en première instance lors de l'évaluation initiale d'un patient repose sur l'histoire clinique de même que sur le type de pathologie cardiaque à investiguer [53].

#### 1.7.4.1. **Échocardiographie de repos et à l'effort**

L'échographie cardiaque transthoracique de repos est une modalité d'imagerie en 2-dimensions, en temps réel, générant des images topographiques de haute résolution des structures cardiaques permettant d'évaluer l'intégrité du muscle et des valves cardiaques (Figure 15). Elle permet d'identifier toutes anomalies suggestives d'ischémie ou nécrose myocardique (i.e. hypokinésie – diminution de la contractilité myocardique; akinésie – absence de contractilité myocardique), de détecter la présence de complications mécaniques de l'infarctus aigu du myocarde, d'évaluer la viabilité myocardique et d'établir une stratification du risque CV. De plus, l'appareil permet d'évaluer la dimension des cavités cardiaques, l'épaisseur du muscle cardiaque (i.e. masse cardiaque), la fonction systolique des ventricules, les pressions de remplissage et de la fonction diastolique du ventricule gauche, les pressions systoliques de l'artère pulmonaire (i.e. hypertension artérielle pulmonaire), la taille de l'aorte ascendante et l'espace péricardique (i.e. épanchement péricardique) [53-55]. L'échographie cardiaque réalisée au chevet du patient permet d'identifier rapidement des pathologies alternatives avec présentation clinique similaire à l'IDM, telles que la dissection aortique aiguë, la péricardite aiguë, la sténose aortique valvulaire, la cardiomyopathie hypertrophique et l'embolie pulmonaire [54].

L'échocardiographie de contraste consiste à combiner l'imagerie par ultrasons à un agent de rehaussement (microbulles ou produit de contraste commercialisé) permettant d'opacifier le ventricule gauche (VG) afin de mieux définir les parois de l'endocarde et d'évaluer la fonction systolique globale et segmentaire. Cette technique permet de quantifier le volume du VG et d'établir précisément la

fraction d'éjection, d'évaluer les anomalies régionales de contractilité, d'éliminer la présence d'une masse intracardiaque (i.e. tumeur, thrombus) ou d'un pseudo-anévrisme [54].



**Figure 15.** Échocardiographie de repos. (a) Parasternal long axe et; (b) parasternal court axe. OG : oreillette gauche; VD : ventricule droit; VG : ventricule gauche. Tirée de : [http://folk.ntnu.no/stoylen/strainrate/Basic\\_ultrasound](http://folk.ntnu.no/stoylen/strainrate/Basic_ultrasound).

L'échocardiographie d'effort ou « de stress » a pour but de comparer la contractilité des parois cardiaques (i.e. cinétique segmentaire), la perfusion myocardique, les gradients de pressions intracardiaques, la pression artérielle pulmonaire, la régurgitation valvulaire ou les pressions de remplissages avant et après un stress physique ou pharmacologique dans le but d'identifier des conditions pathologiques non décelables au repos [54]. L'épreuve d'effort peut être réalisée sur tapis roulant ou sur ergocycle, avec acquisition d'images échographiques au pic de l'effort physique. Puisque les anomalies de cinétiques régionales de contractilité sont induites à l'effort en présence d'ischémie myocardique et que celles-ci persistent généralement quelques minutes après l'arrêt de l'effort/exercice, les altérations régionales de contractilité des parois myocardiques sont décelées en comparant les images prises immédiatement après l'exercice aux acquisitions de repos (pré-effort). L'ischémie myocardique se manifeste généralement par des anomalies nouvelles ou aggravées de la cinétique segmentaire, d'un retard de contraction myocardique, d'une dilatation du VG (si sévère) ou d'une diminution de la fraction d'éjection systolique [55].

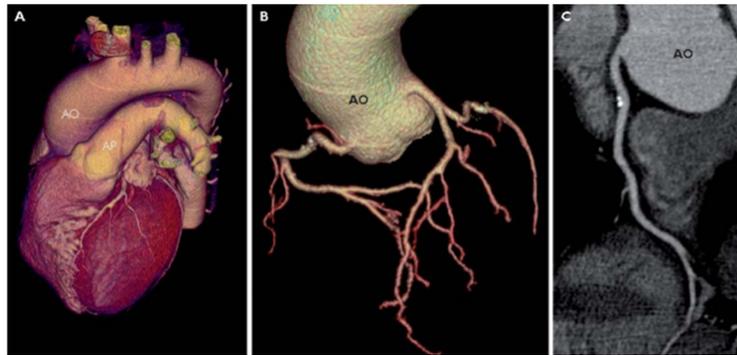
L'échocardiographie de stress peut également être réalisée avec des agents pharmacologiques chez les patients qui sont dans l'incapacité de réaliser un effort physique ou lorsqu'on veut évaluer la présence de viabilité myocardique. La dobutamine, agent le plus fréquemment utilisé en laboratoire d'échographie cardiaque, est un médicament inotrope stimulant les récepteurs bêta-adrénergiques qui, administré par voie intraveineuse à doses incrémentielles, provoque une accélération progressive de la fréquence cardiaque et augmente la contractilité du myocarde. Ainsi, en présence d'une sténose coronarienne significative, l'augmentation de la consommation en oxygène du myocarde va générer de l'ischémie par manque d'apport en O<sub>2</sub>, menant ainsi à une diminution de la contractilité d'un territoire myocardique pouvant être visualisée par échographie. L'adénosine et le dipyridamole, moins fréquemment utilisés, sont des agents vasodilatateurs qui génèrent un « vol coronarien » et ainsi provoquent une ischémie relative par diminution de perfusion des segments du myocarde suppléés par une artère coronaire sténosante [54, 55].

#### **1.7.4.2. L'angiographie coronaire par tomодensitométrie**

L'angiographie coronaire par tomодensitométrie est une modalité d'imagerie non invasive permettant l'acquisition rapide d'images des artères coronaires et la détection de calcifications. Ayant une VPN très élevée (99%), la tomодensitométrie coronaire est une alternative très efficace à l'angiographie coronarienne invasive pour exclure une MCAS significative chez les patients avec symptômes suggestifs d'ischémie myocardique ayant une probabilité pré-test faible à intermédiaire [54, 56]. Cependant, cette modalité d'imagerie non invasive est moins précise pour établir le degré de sévérité des sténoses coronaires et la présence de lésions intermédiaires nécessitent d'effectuer des investigations supplémentaires par épreuve d'effort ou par angiographie coronarienne conventionnelle (Figure 16).

Le score calcique, reflétant le contenu en calcium des artères coronaires, s'avère utile pour la stratification du risque des patients asymptomatiques à risque

intermédiaire de MCAS et est hautement corrélé à la survenue d'événements cardiovasculaires adverses. Selon une étude de cohorte prospective menée par la base de données de la *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA), un score calcique >400 est associé à un risque élevé d'événements cardiovasculaires [57]. Bien que la présence de calcium dans les artères coronaires soit liée à la présence d'athérosclérose, l'abondance de calcifications est faiblement corrélée au degré de sévérité de sténoses coronaires endoluminales et peut ainsi sous-estimer le fardeau de la MCAS en excluant les plaques non calcifiées [54, 58]. Puisque le score calcique est peu sensible pour les lésions coronariennes obstructives, il ne devrait en lui seul être utilisé pour l'investigation des patients symptomatiques [55, 57].



**Figure 16.** Angioscanner coronaire. (a) Reconstruction volumétrique en 3D du cœur et (b) des artères coronaires; (c) reconstruction planaire de l'artère coronaire droite. Tirée de : <https://www.revmed.ch/RMS/2008/RMS-159/Imagerie-cardiaque-non-invasive-apport-specifique-en-clinique-des-nouvelles-modalites-I>

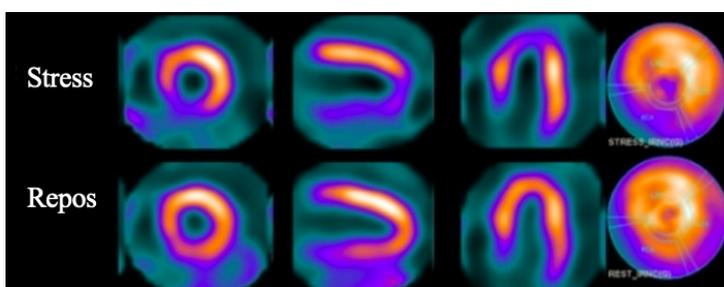
Afin d'obtenir des images de qualité, il est impératif d'avoir un rythme cardiaque régulier et une fréquence cardiaque lente afin d'éviter tous artéfacts de mouvements lors de l'acquisition des images par tomodensitométrie. Ainsi cette modalité d'investigation non invasive devrait être contre-indiquée chez les patients avec tachycardie, en fibrillation auriculaire ou avec rythme cardiaque irrégulier. De plus, la présence d'insuffisance rénale significative constitue une contre-indication à cet examen compte tenu de l'injection d'agents de contraste iodés pouvant induire une néphrotoxicité [57]. L'investigation cardiovasculaire par tomodensitométrie ne devrait

être réalisée chez les patients avec obésité morbide puisque les images générées sont dégradées par une pénétrance atténuée des rayons X, rendant leur interprétation difficile. De surcroît, comme ils génèrent des artéfacts importants lors d'acquisitions des images, les patients ayant des tuteurs métalliques coronariens, de même que des calcifications sévères, ne devraient être référés pour une tomодensitométrie cardiaque.

#### 1.7.4.3. Tomographie par émission monophotonique (TEMP)

La tomographie par émission monophotonique est une technique d'imagerie nucléaire qui repose sur le principe de la scintigraphie permettant de réaliser des images et des reconstructions en trois dimensions (3D) des organes et de leur métabolisme, au moyen de gamma caméras. [59] Il est nécessaire d'injecter au préalable un radiopharmaceutique (i.e. traceur) dont les propriétés chimiques assurent sa fixation sélective et avec une grande affinité à des cibles moléculaires, permettant ainsi de mettre en évidence certains processus biologiques *in vivo* durant le développement de la plaque d'athérosclérose [59, 60]. Suivant l'injection du radiotracer, les isotopes se fixent pendant un certain temps aux myocytes viables. Le nombre de photons émis par les myocytes est proportionnel au degré de captation du traceur, qui est proportionnel à la perfusion myocardique (Figure 17). Les photons captés par le gamma caméra sont transformés en lumière puis en signal électrique, reproduisant un tomogramme du cœur. Les radiotraceurs les plus fréquemment utilisés pour l'imagerie cardiaque sont le thallium-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ) et les traceurs liés au technetium-99m ( $^{99\text{m}}\text{T}$ ), dont le tetrofosmin et le sestamibi [59]. La TEMP permet de localiser le défaut de perfusion myocardique, de même que la sévérité du déficit, l'étendue et le degré de réversibilité au repos et à l'effort (physiologique ou pharmacologique). Une captation élevée du traceur par les poumons après un effort est généralement associée à une MCAS pluritronculaire par augmentation de la pression capillaire pulmonaire bloquée (PCPB) et d'une diminution de la fraction d'éjection du VG [59]. Les cibles moléculaires de la plaque d'athérome à l'étude sont les molécules d'adhésion cellulaires, les lipoprotéines, les macrophages, les protéases, les glycoprotéines et l'apoptose [61].

La principale application clinique de la TEMP en cardiologie est la perfusion myocardique aux différentes étapes du cycle cardiaque, de même que sa cinétique globale et régionale [60]. La synchronisation de la TEMP à l'ECG permet d'étudier la fonction ventriculaire et la perfusion myocardique en simultanée [62]. La TEMP permet d'identifier les patients en angine stable pouvant bénéficier d'une revascularisation pouvant diminuer le risque d'événements CV adverses. Les principales limitations de cette technique d'imagerie sont les radiations émises par la TEMP et sa faible résolution spatiale (10-16 mm en imagerie clinique) [59-63].

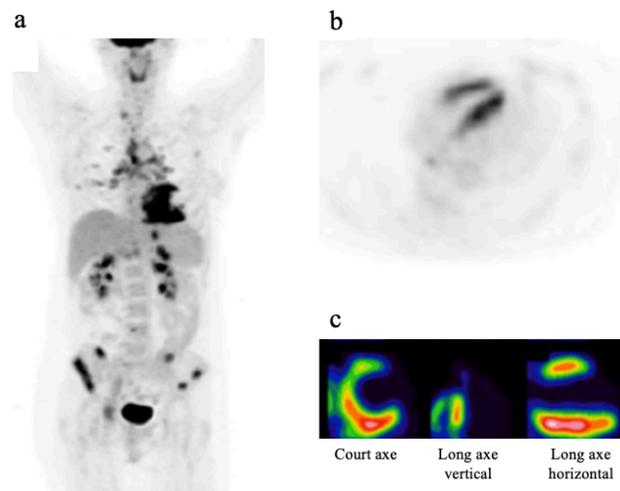


**Figure 17.** Scintigraphie myocardique. (a) Images réalisées au repos et (b) à l'effort suivant l'injection de  $^{99m}\text{T}$ -tetrofosmin. Présence d'ischémie de la paroi inféroseptale du ventricule gauche, atteignant l'apex. Adaptée de [64].

#### 1.7.4.4. Tomographie à émission de positrons (TEP)

La TEP est une modalité d'imagerie permettant de mesurer en 3D une activité métabolique ou moléculaire d'un organe grâce à l'émission de positrons provenant de l'injection de radiopharmaceutiques (Figure 18). L'annihilation des positrons émis suivant la désintégration de l'atome radioactif produit deux photons  $\gamma$  se dirigeant en sens opposé et qui sont détectés simultanément par l'appareil, ce qui permet de localiser et quantifier le traceur dans l'organe avec une meilleure résolution que le TEMP et de visualiser l'activité du métabolisme des cellules sous la forme d'une image 2D ou 3D [61]. Les isotopes utilisés, dont le fluor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), le carbone-11 ( $^{11}\text{C}$ ), le cuivre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), l'oxygène-15 ( $^{15}\text{O}$ ), le gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), le rubidium-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et l'azote-13 ( $^{13}\text{N}$ ), ont une courte demi-vie, ce qui nécessite une production par un cyclotron [61]. La principale application clinique de la TEP en

cardiologie est la recherche de viabilité chez les patients post-infarctus du myocarde, de même que la détection d'inflammation au sein de la plaque [60]. Les cibles moléculaires principales sont les molécules d'adhésion cellulaire, les intégrines, l'angiogénèse, les calcifications et la fibrine [60]. Les limites associées à la modalité d'imagerie par TEP sont les radiations émises par les radiotraceurs de même que la nécessité d'avoir un cyclotron à proximité des centres d'examen de par la courte demi-vie des isotopes radioactifs utilisés et la faible résolution spatiale. De plus, la faible résolution de la TEP, de même que les artéfacts de mouvements cardiaques et respiratoires, la captation élevée du myocarde pour le  $^{18}\text{F}$ -FDG et le petit calibre des vaisseaux coronariens, limitent l'interprétation du signal provenant des artères coronaire [61-63].

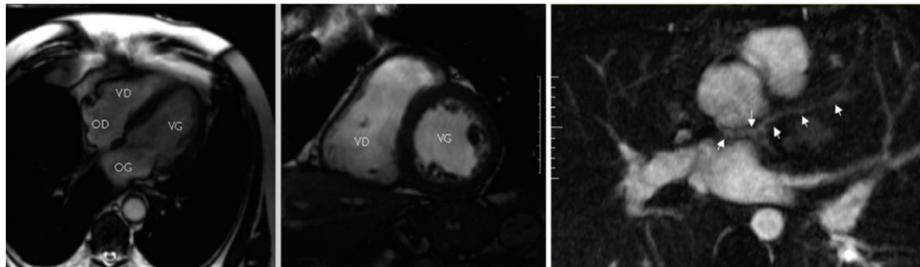


**Figure 18.** TEP au Rubidium-82/FDG. (a) Captation focale du traceur dans les parois inférieure, inféroseptale et antéro-septale du VG et paroi libre VD; (b) Vue transaxiale du cœur; (c) Images en court axe, long axe vertical et horizontal de la captation au Rubidium-82/FDG. Adaptée de : <https://www.acc.org/education-and-meetings/patient-case-quizzes/fdg-pet-for-cardiac-sarcoid>.

#### 1.7.4.5. Imagerie par résonance magnétique cardiaque (IRM)

La résonance magnétique cardiaque est une modalité d'imagerie dont le principe de base repose sur l'excitation des noyaux d'hydrogènes contenus dans l'eau

et le gras des tissus par impulsions d'ondes radiofréquences, dont le recouvrement de l'énergie électromagnétique permet de reproduire des images anatomiques et d'évaluer la présence d'œdème tissulaire. L'injection d'un agent de contraste, le gadolinium ( $^{64}\text{Gd}$ ), permet d'évaluer la présence de fibrose myocardique et ainsi s'avère utile notamment dans l'évaluation de la viabilité myocardique [65]. L'IRM permet d'évaluer plusieurs formes de pathologies cardiaques de par sa capacité à caractériser les tissus mous, dont les atteintes du muscle cardiaque (i.e. cardiomyopathies), les masses cardiaques et autres anomalies cardiaques rares. L'IRM peut également être utilisée pour évaluer la perfusion myocardique et la cinétique régionale de contractilité des parois à l'effort/en stress, de même que pour l'imagerie non invasive des artères coronaires (Figure 19) [65].



**Figure 19.** Images des structures cardiaques et des artères coronaires acquises par IRM. OD : oreillette droite; OG : oreillette gauche; VD : ventricule droit; VG : ventricule gauche. Adaptée de [66].

Tout comme la TDM, les acquisitions sont synchronisées à l'ECG et un rythme cardiaque rapide et/ou irrégulier permet d'obtenir difficilement des images de qualité. L'examen dure toutefois substantiellement plus longtemps et les acquisitions sont réalisées en apnée, ce qui est contraignant chez les patients dyspnéiques [65]. Un des avantages de l'IRM est l'absence de rayons X, ce qui est très bénéfiques pour les patients nécessitant des examens répétés lors du suivi. Bien que la majorité des prothèses valvulaires mécaniques et les tuteurs coronariens soient compatibles avec l'IRM, la présence de certains dispositifs métalliques sont contre-indiqués avec cette modalité d'imagerie, dont les pacemakers et défibrillateurs implantables d'anciennes générations, les implants cochléaires ou clips neurochirurgicaux [65]. De plus, cet

examen est proscrit chez tous patients avec insuffisance rénale aiguë (IRA) ou chronique (IRC) ayant un taux de filtration glomérulaire (TFG) inférieur à 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> ou hémodialysés en raison du risque associé de fibrose systémique néphrogénique, pathologie similaire à la sclérodermie, induit par le gadolinium chélaté [67].

### **1.7.5. Modalité d'imagerie invasive – l'angiographie coronarienne**

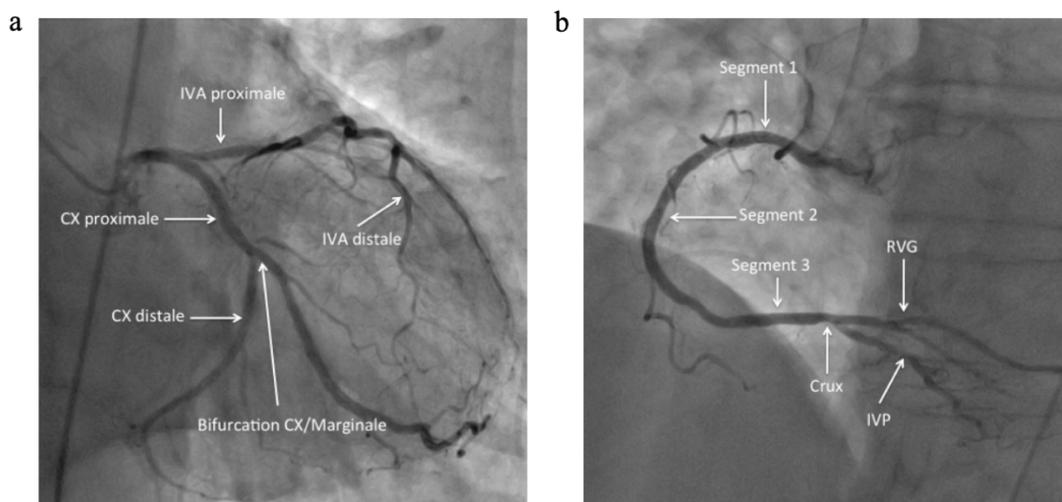
#### **1.7.5.1. Principe**

L'angiographie coronarienne invasive conventionnelle, également désignée coronarographie, est la modalité de choix pour la visualisation des artères coronaires et demeure l'étalon-or pour le diagnostic de sténoses coronaires épicaudales et la prise en charge thérapeutique des patients [68]. Cette technique est réalisée sous anesthésie locale par voie artérielle transradiale ou fémorale, selon l'anatomie du patient, et l'utilisation de cathéters de petits diamètres permet d'injecter de façon sélective un agent de contraste iodé afin de visualiser les artères coronaires gauche et droite, respectivement (Figure 20) [69]. Différentes projections sont réalisées avec degrés d'angulation variables de la source de rayons X afin de visualiser l'ensemble de l'arbre coronarien, tout en évitant les superpositions de vaisseaux [70]. L'usage de cathéters de plus gros diamètres internes permet d'introduire des guides, des ballons et des tuteurs coronariens nécessaires à la réalisation d'une angioplastie coronarienne [71].

#### **1.7.5.2. Limitations**

Bien qu'elle permette d'évaluer la présence d'athérosclérose coronarienne, de définir les options thérapeutiques et le pronostic des patients, l'angiographie coronarienne conventionnelle demeure une modalité d'imagerie bidimensionnelle pouvant sous-estimer la sévérité de plaques d'athéromes selon l'angle d'incidence du faisceau de rayons X [70]. De surcroît, cette modalité d'imagerie est un

« luminogramme » et ainsi ne permet pas de visualiser directement la plaque d'athérome dans la paroi artérielle, ce qui constitue une limitation majeure dans l'évaluation du fardeau de la MCAS [72]. Le développement d'outils d'imagerie intravasculaire a permis de pallier cette limitation et ont des applications précises tant en clinique qu'en recherche (i.e. chapitre 3) [72].



**Figure 20.** Angiographie coronaire. (a) Projection de la coronaire gauche et (b) coronaire droite, tirées de <http://www.cardio-paramed.com/fr/les-incidences-radiologiques.html>. Cx : artère circonflexe; IVA : artère interventriculaire antérieure; IVP : interventriculaire postérieure; RVG : rétroventriculaire gauche

### 1.7.5.3. **Recommandations**

La revascularisation percutanée a démontré un bénéfice potentiel sur la survie, par comparaison au traitement médical seul, chez les patients avec ischémie extensive touchant > 10-12% du myocarde à la scintigraphie myocardique [73]. Les indications actuelles pour la revascularisation coronarienne percutanée ou chirurgicale chez les patients avec angine stable ou ischémie silencieuse sont : (1) la persistance des symptômes malgré le traitement médical optimal et/ou; (2) pour améliorer le pronostic clinique [74]. Selon les dernières lignes directrices européennes sur la revascularisation myocardique, les recommandations de classe I pour la revascularisation à visée

pronostique chez les patients avec angine stable ou ischémie silencieuse sont basées sur l'étendue de la MCAS [75] :

- Sténose >50% du tronc commun
- Sténose >50% de l'IVA proximale
- Atteinte de 2- ou 3-vaisseaux avec sténose >50% et dysfonction VG (FeVG  $\leq$ 35%)
- Large territoire ischémique détecté par imagerie fonctionnelle non invasive (10% >VG) ou par modalité invasive (réserve de débit fractionnaire – FFR)
- Une seule artère coronaire perméable avec sténose >50%

La prise de décision entourant le type de revascularisation à prodiguer, soit par intervention coronaire percutanée (ICP) ou par pontage aorto-coronarien (PAC), repose sur différents critères, dont la mortalité chirurgicale prédite (i.e. EuroSCORE I et II; score STS) [76-78], la complexité anatomique de la MCAS (i.e. score SYNTAX) et la probabilité d'offrir une revascularisation complète [75]. Elle devrait impliquer tous les intervenants en santé, communément appelé le « Heart Team », dans le but d'offrir aux patients coronariens la meilleure option thérapeutique basée sur les différents éléments cardiaques et extracardiaques. Le score SYNTAX a été développé prospectivement afin d'évaluer la complexité des lésions coronariennes chez les patients avec maladie coronarienne tritronculaire ou atteinte du tronc commun. Dans la cohorte de patients inclus dans l'étude SYNTAX, le score SYNTAX s'est avéré être un facteur prédictif indépendant de décès et d'événements majeurs cardiaques et cérébrovasculaires adverses à long terme chez les patients traités par ICP [79]. La complexité anatomique se définit selon les tertiles du score SYNTAX (faible; 0-22, intermédiaire; 23-32; élevé; >33), permettant de stratifier les patients qui auront une évolution clinique similaire suivant un traitement par ICP ou par PAC de ceux qui bénéficieront davantage du traitement chirurgical. Les patients avec maladie pluritronculaire ayant un score SYNTAX >22 semblent bénéficier davantage d'une revascularisation chirurgicale par pontages, de même que ceux avec diabète mellitus,

dysfonction VG sévère (FeVG  $\leq 35\%$ ), resténoses intra-tuteurs récidivantes et lors d'une contre-indication au traitement antiplaquettaire [75].

## 1.8. Diagnostic différentiel

Plusieurs pathologies cardiovasculaires non coronariennes et non cardiovasculaires peuvent se manifester par une douleur thoracique aiguë et/ou prolongée (Tableau VII). Ainsi, l'évaluation initiale d'un patient doit être rigoureuse et inclure une histoire clinique complète et un examen physique détaillé afin de prescrire les examens paracliniques appropriés pour établir le bon diagnostic et exclure toutes conditions aiguës / urgentes.

Cardiovasculaire	Pulmonaire	Gastro-intestinal	Paroi thoracique	Neurologique	Psychiatrique
Dissection aortique	Embolie pulmonaire	Œsophagite	Costochondrite	Maladie cervicale	Troubles anxieux
Insuffisance cardiaque congestive	Pneumothorax	Spasme œsophagien	Fibromyalgie	Herpès Zoster	Hyperventilation
Péricardite aiguë	Pleurésie	Colique biliaire	Fracture de côte		Douleurs chroniques
Syndrome X (maladie microvasculaire)	Hypertension pulmonaire primaire	Cholécystite	Arthrite		Troubles affectifs
		Cholangite	sternoclaviculaire		Troubles somatoformes
		Cholédocolithiase			
		Ulcère peptique			
		Pancréatite			

**Tableau VII.** Diagnostic différentiel chez les patients présentant des douleurs thoraciques, adapté de [30].

## 1.9. Traitements de la MCAS

Les patients atteints de coronaropathie sont à haut risque d'événements cardiovasculaires adverses majeurs, dont le décès CV, l'IDM et l'AVC. Le traitement de la MCAS englobe plusieurs mesures non pharmacologiques et pharmacologiques ayant pour but d'assurer une prise en charge adéquate des facteurs de risque CV, de stabiliser et traiter la condition cardiaque sous-jacente et de prévenir la survenue d'événements cardiovasculaires adverses futurs.

### **1.9.1. Traitements non pharmacologiques**

L'étude internationale INTERHEART a permis de démontrer que six facteurs de risque CV tels que la dyslipidémie, le tabagisme, l'hypertension artérielle (HTA), le diabète, l'obésité abdominale et le stress, augmentent le risque de survenue d'IDM aigu de plus de 90% [80]. En contrepartie, il fut démontré que la consommation quotidienne modeste d'alcool, en fruits et légumes et l'activité physique régulière confèrent des effets protecteurs [80]. Plusieurs approches ont été développées à l'échelle planétaire afin de modifier les habitudes de vie jugées néfastes et ainsi diminuer le risque de survenue de maladies cardiovasculaires.

#### **1.9.1.1. Exercice physique**

L'exercice entraîne une réduction du risque de maladies cardiovasculaires d'environ 30% [81], soit une diminution d'amplitude similaire à celle associée aux traitements antihypertenseurs et hypolipémiants [82, 83]. L'exercice entraîne des effets directs sur le système vasculaire de par l'impact d'une augmentation des forces de cisaillement appliquées sur l'endothélium, se traduisant par des modifications fonctionnelles et structurelles réduisant le risque de formation de plaques d'athérome [84]. De surcroît, l'exercice régulier a des effets bénéfiques sur le risque de survenue de diabète, d'hypertension artérielle et d'hypertriglycémie, et augmente les niveaux plasmatiques des lipoprotéines de haute densité (HDL-cholestérol) [85]. Les lignes directrices américaines et européennes en prévention recommandent 150 minutes d'exercice aérobique d'intensité modérée par semaine, idéalement par périodes de 10 minutes [86, 87].

#### **1.9.1.2. Diète**

L'adoption d'une saine alimentation fait partie des changements comportementaux visant à améliorer le profil lipidique et à réduire substantiellement

le risque d'événements CV. De plus, la nutrition est la pierre angulaire de la gestion et de la stabilité du poids corporel, dont l'adoption d'une diète équilibrée assure une nutrition adéquate par maintien d'une balance entre les apports caloriques et les dépenses énergétiques. *L'AHA* recommande la diète DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*) faible en sucres et gras saturés, riches en légumes, fruits et grains entiers, afin de réduire la pression artérielle et les lipoprotéines de faible densité (LDL-cholestérol), tous deux facteurs de risque CV [87]. *L'European Society of Cardiology (ESC)* préconise l'adoption d'une diète Méditerranéenne, soit d'éviter les gras saturés tout en augmentant les apports en fibres, fruits, légumes et poissons [86]. La mise à jour des lignes directrices canadiennes sur le diagnostic et traitement de la dyslipidémie recommande à la fois les diètes DASH et Méditerranéenne afin d'améliorer le profil lipidique, mettant l'emphase sur une diète riche en fruits et légumes, céréales à grains entiers et gras polyinsaturés ou mono-insaturés (acides gras oméga-3) et un apport quotidien en fibres (>30 g) [88]. Ils suggèrent également d'éviter toutes formes de gras *trans* et de limiter les apports en gras saturés [88].

### 1.9.1.3. **Tabagisme**

Le tabagisme est l'un des facteurs de risque majeur pour la maladie cardiovasculaire et double le taux de mortalité CV à 10 ans [89]. Il semble avoir une relation linéaire et dose-dépendante entre le nombre de cigarettes consommées quotidiennement et le risque CV [90]. L'exposition passive au tabac dans les lieux publics semble avoir des effets délétères similaires et fut associée à une augmentation du risque CV d'environ 30% [88].

La cessation tabagique est l'intervention la plus rentable pour prévenir le développement et la prévention de la maladie coronarienne [88]. Toutes les lignes directrices recommandent invariablement l'arrêt du tabac, dont certains bénéfices peuvent s'observer dès les premiers mois de l'arrêt [86-88]. Le recours aux

traitements pharmacologiques semble augmenter les probabilités d'abstinence au tabagisme, avec un taux d'abstinence entre 50-70% suivant la prise d'un agoniste partiel des récepteurs nicotiques du système nerveux central, la varenicline (Champix®, Pfizer, Canada) [91].

#### 1.9.1.4. Poids corporel

L'obésité est associée à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire et affecte négativement la fonction cardiaque et les comorbidités liées à la MCAS [92]. Par définition, un patient obèse a un indice de masse corporelle (IMC)  $>30$  kg/m<sup>2</sup>, alors qu'un IMC entre 25-29.9 kg/m<sup>2</sup> se définit par de l'embonpoint [92]. Il fut démontré qu'un IMC  $>25$  constitue un facteur de risque de maladie cardiovasculaire, avec le plus faible taux de mortalité toutes causes confondues observé chez les individus ayant un IMC entre 20 et 25 [93]. Malgré que le poids idéal soit défini par un IMC situé entre 18.5 à 24.9, aucune ligne directrice n'a émis de recommandation spécifique quant aux mesures à suivre pour atteindre le poids santé en vue de réduire le risque CV [92]. Il est toutefois préconisé de maintenir le poids santé au long terme en balançant l'activité physique et l'apport équilibré journalier en calories [88, 93].

Bien que l'IMC soit un bon prédicteur du risque CV, surtout à des niveaux élevés, l'adiposité viscérale et la graisse hépatique sont des facteurs prépondérants du risque CV [94]. L'hétérogénéité du risque CV chez les individus obèses semble varier en fonction de la localisation des dépôts adipeux et la réduction des graisses viscérales par réduction du tour de taille est devenue une cible importante dans l'amélioration du risque CV. Ainsi, *Hypertension Canada* recommande aux individus non hypertendus un tour de taille  $<102$  cm pour les hommes et  $<88$  cm pour les femmes [95].

## 1.9.2. Traitements pharmacologiques

### 1.9.2.1. Hypolipémiants

Le traitement de la dyslipidémie a été l'une des mesures thérapeutiques les plus efficaces en prévention primaire et secondaire de la MCAS. Plusieurs études ont démontré qu'une diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol réduit le risque de récurrence d'événements coronariens [96, 97]. Les lipoprotéines contenues dans l'apolipoprotéine B (apoB), particulièrement les LDL-C, sont au cœur du processus d'athérogenèse [98]. Une réduction de 1.0 mm/L des niveaux de LDL-C engendre une réduction du risque de mortalité cardiovasculaire et d'IDM non fatal de 20 à 25% [86].

Les lignes directrices internationales de toutes les sociétés recommandent un contrôle intensif du cholestérol par prise d'inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase, communément appelés statines, afin de diminuer les niveaux sériques de LDL-C, en plus des modifications des habitudes de vie et contrôle de la pression artérielle et de la glycémie [88, 99, 100]. Il est recommandé d'initier un traitement en prévention primaire chez tous les patients ayant un LDL-C sérique  $\geq 5.0$  mm/L, et ce indépendamment du profil de risque [88, 99]. Les lignes directrices canadiennes ont fixé les valeurs de LDL-C nécessitant l'instauration d'un traitement en prévention primaire selon le niveau de risque de MCAS estimé par le score de Framingham. En prévention secondaire, tous les patients avec MCAS doivent avoir un contrôle strict du profil lipidique, avec comme cible un LDL-C sérique  $< 2.0$  mmol/L [88]. Les recommandations de l'*ACC/AHA* et de l'*ESC* en prévention secondaire visent un niveau de LDL-C  $< 2.6$  mmol/L, avec comme cible LDL-C  $< 1.8$  mmol/L chez les patients à très haut risque d'événements CV [99, 100]. Malgré la réduction substantielle des événements CV, mortalité CV et toutes causes confondues démontrés dans des études cliniques à grande échelles sur les statines, un risque résiduel important subsiste dans la prévention et le

traitement des maladies cardiovasculaires [96]. D'autres thérapies sont également utilisées en combinaison avec les statines, dont les fibrates, la niacine, l'ézetimibe et les séquestrants d'acides biliaires, chez les patients dont le profil lipidique n'est pas optimisé par la prise de statines en monothérapie [101]. L'avènement de nouveaux agents hypolipémiants, les inhibiteurs de la *proprotein convertase subtilisin-kexin type 9* (PCSK9), sont associés à une réduction substantielle des niveaux de LDL-C sérique atteignant 60% lorsque combinés aux statines [101]. De plus, l'étude FOURIER a démontré une réduction du risque d'événements cardiovasculaires, suggérant un bénéfice clinique chez les patients avec MCAS [102].

#### 1.9.2.2. Antihypertenseurs

L'hypertension artérielle est un facteur de risque indépendant pour le développement de maladies cardiovasculaires et atteint 25% de la population adulte canadienne [103]. Bien qu'il ait des différences entre les lignes directrices en ce qui a trait aux valeurs seuils pour l'initiation d'un traitement de même que les cibles tensionnelles à atteindre, tous recommandent d'initier un traitement lorsque la tension artérielle (TA) est >140/90 mm Hg [95, 104, 105]. La mise à jour récente des lignes directrices *d'Hypertension Canada* recommande de traiter les patients diabétiques et à risque cardiovasculaire élevé lorsque la TA est > 130/80 mm Hg (Tableau VIII) [95].

Le traitement de l'hypertension artérielle comprend la prise en charge des habitudes de vie, dont la perte de poids, l'activité physique régulière, une consommation limitée d'alcool, l'adoption d'un régime équilibré avec un apport faible en sodium et la gestion du stress [95]. Plusieurs traitements pharmacologiques peuvent être initiés en monothérapie ou combinés afin d'atteindre les cibles tensionnelles visées. Il est recommandé de prioriser certaines classes de

médicaments chez les patients avec MCAS, dont les bêtabloqueurs et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA)/bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine (BRA). Plusieurs études cliniques ont démontré que les bêtabloqueurs réduisent le risque de récurrence d'IDM, de mort subite et la mortalité chez les patients ayant subi un SCA, incluant les non hypertendus [106, 107]. De plus, deux grandes études randomisées, *the Heart Outcomes Prevention Evaluation study (HOPE)* et *the European Trial on Reduction of Cardiac Events with Perindopril in Stable Coronary Artery Disease (EUROPA)* ont démontré les bénéfices des IECA sur la mortalité CV et l'IDM en prévention secondaire chez les patients avec maladie coronarienne stable [108, 109]. Ainsi, l'instauration d'un régime thérapeutique par bêtabloqueur et IECA est recommandée en première intention chez les patients angineux avec MCAS connue, de même que ceux avec antécédents d'IDM récent (prévention secondaire) et insuffisance cardiaque systolique avec FeVG <40% [30, 95].

Populations de patients	Valeurs seuils de TA (mm Hg) pour initier un traitement	Cibles thérapeutiques de TA (mm Hg)
Faible risque (absence d'atteinte d'organe ou facteurs de risque CV)	TA systolique ≥160 TA diastolique ≥100	TA systolique <140 TA diastolique <90
Haut risque de maladie cardiovasculaire - Maladie cardiovasculaire clinique ou subclinique - IRC (néphropathie non diabétique, protéinurie 1g/24 h, TFG 20-59 ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ) - Risque CV global estimé à 10 ans >15%* - Age ≥75 ans	TA systolique ≥130	TA systolique <120
Diabétiques	TA systolique ≥130 TA diastolique ≥80	TA systolique <130 TA diastolique <80
Autres	TA systolique ≥140 TA diastolique ≥90	TA systolique <140 TA diastolique <90

\* Score de risque de Framingham

CV : cardiovasculaire; IRC : insuffisance rénale chronique; TA : tension artérielle; TFG : taux de filtration glomérulaire.

**Tableau VIII.** Recommandations de *Hypertension Canada* sur les valeurs seuils de tension artérielle (TA) pour initier un traitement et les cibles thérapeutiques à atteindre chez l'adulte [95].

### 1.9.2.3. **Contrôle glycémique**

Le taux de mortalité toutes causes et cardiovasculaire est significativement plus élevé chez les diabétiques que chez les non diabétiques [110]. Ainsi, le contrôle glycémique est capital chez les patients avec diabète mellitus puisqu'une glycémie débalancée augmente de façon substantielle le risque de complications macrovasculaires et microvasculaires (néphropathie, cécité, maladie vasculaire périphérique, etc.) [111, 112]. Les recommandations émises par le comité d'expert de *Diabetes Canada*, de même que d'autres sociétés, sont d'assurer un contrôle glycémique en ciblant un niveau d'hémoglobine glyquée (HbA1c) <7% [113]. Plusieurs agents hypoglycémisants sont disponibles sur le marché et agissent par différents mécanismes d'action, dont certains ont démontré des effets cardiovasculaires bénéfiques, incluant la metformine (glucophage<sup>®</sup>, biguanide), le liraglutide (Victoza<sup>®</sup>, Novo Nordisk, Danemark; agoniste des récepteurs glucagon-like peptide-1 (GLP-1)) et l'empagliflozine (Jardiance<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim, Canada; inhibiteur du co-transporteur 2 sodium-glucose (SGLT2)) [113-115].

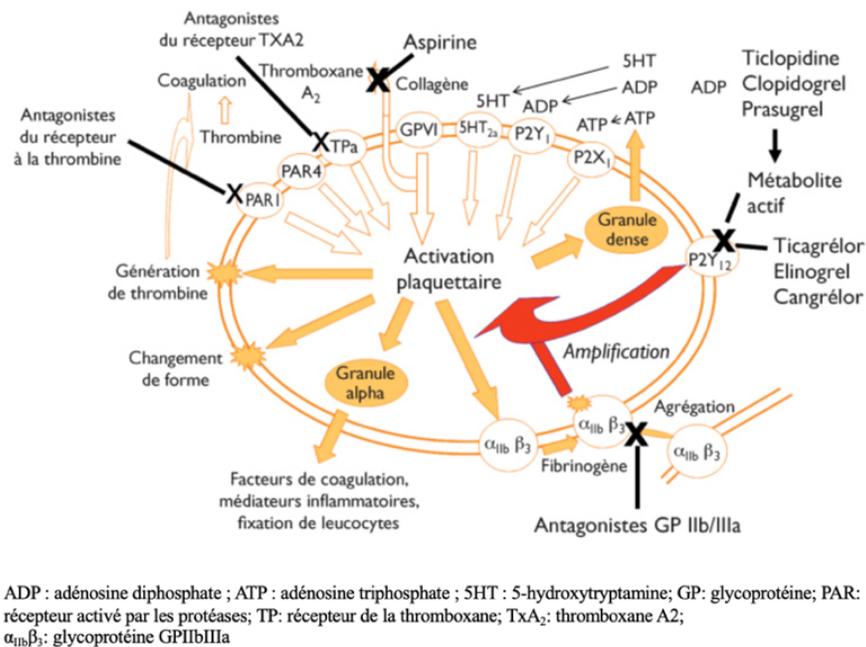
### 1.9.2.4. **Antiplaquettaires**

Les agents antiplaquettaires sont la pierre angulaire du traitement en prévention secondaire de la MCAS, soit lors d'un SCA, chez les patients avec MCAS stable et ceux qui subissent une procédure de revascularisation coronarienne, dont une ICP (Figure 21) [116, 117].

#### 1.9.2.4.1. **L'Aspirine**

L'acide acétylsalicylique, connu sous l'appellation commerciale aspirine, est un anti-inflammatoire non stéroïdien dont le mécanisme d'action est de bloquer la production de thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) par inhibition irréversible de la cyclo-oxygénase 1 (COX1), inhibant ainsi l'activation et l'agrégation

plaquettaire (Figure 21) [119]. Une dose journalière d'acide acétylsalicylique de 81 mg est recommandée, et ce indéfiniment à moins de contre-indication, en prévention secondaire, avec une réduction du risque relatif d'IDM de 25% [30, 120]. Toutefois, l'utilisation de l'aspirine en prévention primaire tant chez les patients diabétiques que non diabétiques n'est pas recommandée puisque le bénéfice absolu de l'agent pharmacologique est largement supplanté par le risque accru de saignements digestifs et d'AVC hémorragique [121, 122].



**Figure 21.** Mécanismes d'activation et d'inhibition plaquettaire. Tirée de [118].

#### 1.9.2.4.2. Antagonistes des récepteurs P2Y purinorécepteur 12 (P2Y<sub>12</sub>)

Les antagonistes des récepteurs P2Y<sub>12</sub> sont de puissants agents antithrombotiques par inhibition de la potentialisation de l'activation plaquettaire générée par l'adénosine diphosphate (ADP) (Figure 21) [119]. Deux classes de médicaments sont disponibles : (1) les thiényridines, pro-drogues induisant une

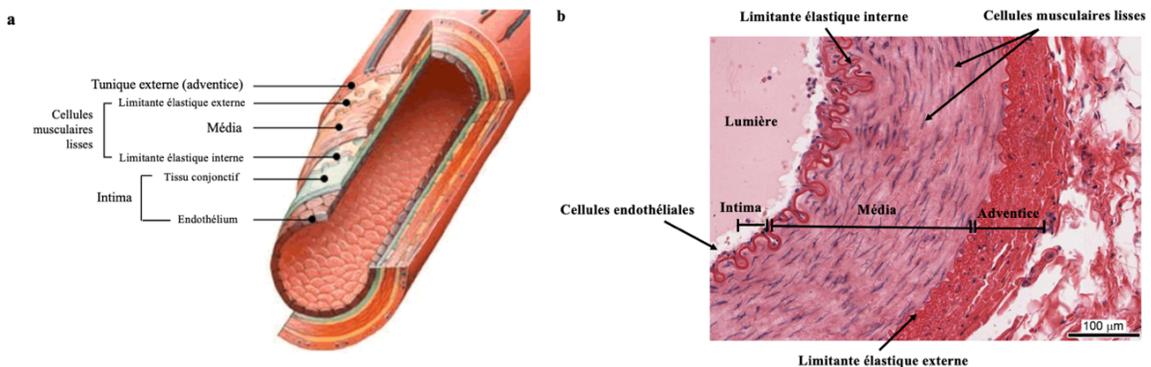
inhibition irréversible des récepteurs P2Y<sub>12</sub> – le clopidogrel (Plavix®; Bristol-Myers Squibb, New York, E-U) et le prasugrel (Effient®; Eli Lilly, Indianapolis, E-U) et; (2) les dérivés des nucléosides-nucléotides, inhibiteurs directs des récepteurs P2Y<sub>12</sub> – le ticagrelor (Brilinta®; Astra Zeneca, Londres, Angleterre) [119].

Le choix du traitement est influencé par la présentation clinique du patient (angine stable vs. SCA), de même qu'au maintien de la balance entre le risque ischémique et le risque de saignement. Le clopidogrel est recommandé, en ajout à l'aspirine, pour les procédures d'ICP électives [123, 124]. Toutefois, 30-40% des patients sous traitement ont une réactivité plaquettaire élevée, suggérant que certains sont résistants au médicament [119]. De plus, jusqu'à 10% des patients ont des événements ischémiques récurrents à 12 mois sur double thérapie antiplaquettaire (DAPT), ce qui a mené au développement de nouveaux agents antiagrégants [125, 126]. Le prasugrel, de même que le ticagrelor, ont été évalués dans de larges études cliniques randomisées chez des patients en SCA et se sont avérés des agents antiplaquetitaires plus puissants que le clopidogrel en réduisant le risque d'événements ischémiques récurrents, mais au détriment de saignements majeurs fatals et non fatals [127, 128]. Ainsi, le choix de la DAPT doit être adapté au patient afin de maximiser les bénéfices cliniques des antiagrégants tout en limitant le risque de saignements, condition très morbide pour les patients coronariens [119]. Puisque les nouveaux agents inhibiteurs P2Y<sub>12</sub> offrent un plus grand bénéfice clinique que le clopidogrel, les lignes directrices de la *SCC* [124], de *l'ACC/AHA* [129] et de *l'ESC* [130] recommandent la combinaison d'aspirine à un agent inhibiteur de P2Y<sub>12</sub> (ticagrelor ou prasugrel) chez les patients en SCA et d'aspirine combinée au clopidogrel à ceux qui subiront une ICP élective. La durée du régime DAPT varie entre 3 à 6 mois pour les ICP électives, selon le niveau de risque de saignement, et est d'au moins 1 an chez les patients avec un SCA [124, 129, 130].

## 2. La biologie vasculaire de l'athérosclérose

### 2.1. Histologie des artères

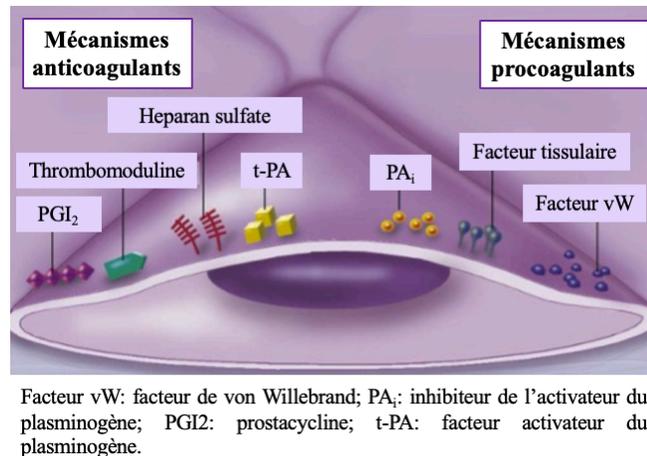
Les artères coronaires épocardiques, de taille moyenne, sont appelées artères musculaires puisque leur tunique moyenne (média) a un contenu plus riche en cellules musculaires lisses et moins dense en fibres élastiques que les artères élastiques de plus gros calibre telle que l'aorte [131]. Celles-ci leurs confèrent la capacité de vasodilatation et vasoconstriction, assurant une perfusion adéquate du myocarde. La paroi d'une artère comprend trois couches concentriques qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle (Figure 22) [131, 132] :



**Figure 22.** Structure histologique d'une artère musculaire saine. (a) Structure macroscopique de la paroi d'une artère et (b) microscopique en coupe histologique. Adaptée de : <http://histology.medicine.umich.edu/resources/cardiovascular-system>

- Tunique interne ou intima : composée d'un épithélium simple formé de cellules endothéliales appelé endothélium et d'une membrane basale (couche sous-endothéliale) composée de tissu conjonctif. L'intima est séparée de la média par la limitante élastique interne. L'endothélium est la couche de cellules qui tapisse la face interne de l'ensemble du système cardiovasculaire et forme une barrière modulant la diffusion sélective de molécules entre le sang et d'autres couches de la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales sont impliquées dans l'hémostase

vasculaire; elles produisent des agents antithrombotiques (prostacyclines, thrombomoduline, PA<sub>i</sub>), des agent prothrombotiques (facteur de von Willebrand, t-PA), un agent fibrinolytique (urokinase), un médiateur de l'inflammation (l'interleukine-1) et des facteurs de croissance (Figure 23). De plus, elles ont à leur surface des récepteurs liant les LDL-C, la thrombine et le facteur X de coagulation [132, 133].



**Figure 23.** Cellule endothéliale vasculaire et les facteurs impliqués dans l'hémostase. Adaptée de [133].

- Tunique moyenne ou média : composée de plusieurs couches de fibres élastiques (collagène type III, élastine, protéoglycans) et de cellules musculaires lisses disposées en anneaux autour de la lumière du vaisseau. La haute teneur en fibres élastiques des artères leur confèrent une grande compliance permettant à leurs parois de s'étirer ou se dilater en fonction d'une augmentation de pression et ce, sans se déchirer. La tunique moyenne est la plus épaisse et est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe.
- Tunique externe ou adventice : composée de fibres élastiques, de fibroblastes et de fibres collagène type I qui sont entourées par la vasa vasorum, des nerfs et un réseau lymphatique. La vasa vasorum est une microcirculation spécialisée qui joue un rôle important dans l'apport en nutriment et en O<sub>2</sub> aux tissus de la paroi vasculaire [134].

## 2.2. Inflammation et initiation de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie chronique progressive et multifactorielle caractérisée par l'accumulation de lipides dans la paroi d'artères de grand et moyen calibre par le biais de multiples interactions complexes entre médiateurs inflammatoires et immuns. L'inflammation joue un rôle central à toutes les phases de l'athérogenèse [135]. Les plaques d'athérome stables sont constituées d'un infiltrat inflammatoire chronique, tandis que les plaques vulnérables se distinguent de par un processus inflammatoire actif impliqué dans l'amincissement de la chape fibreuse, prédisposant ainsi à la rupture [136]. Le défi actuel consiste à identifier les déterminants morphologiques et les biomarqueurs moléculaires permettant de discriminer les plaques stables des plus instables/vulnérables dans le but de stratifier les patients à haut risque d'événements cardio- et cérébrovasculaires avant la survenue de syndromes cliniques.

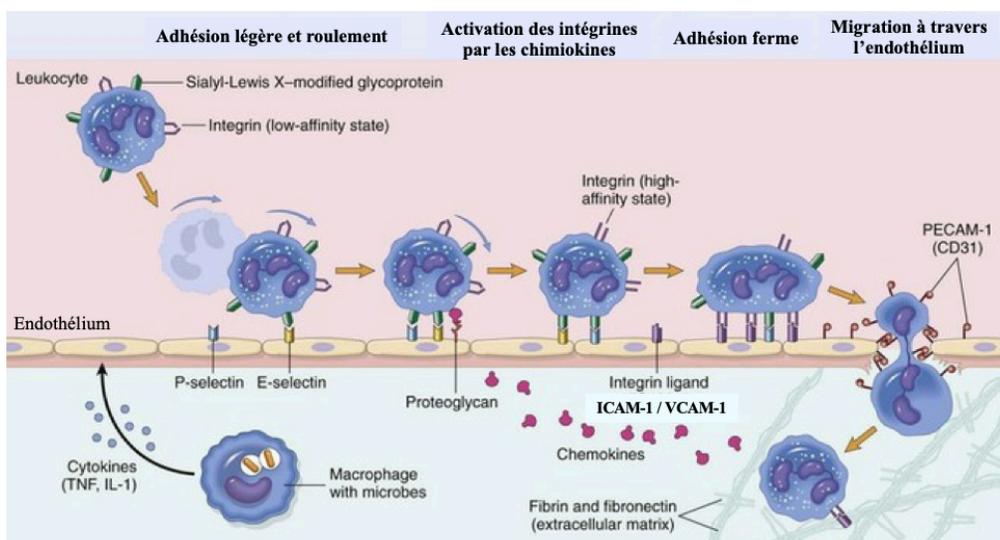
### 2.2.1. Dysfonction endothéliale et accumulation des lipides

La dysfonction endothéliale est une étape cruciale dans le développement précoce de l'athérosclérose, contribuant au développement de la plaque et à la survenue de complications vasculaires. Elle est provoquée par l'exposition prolongée et/ou répétée de l'endothélium à des facteurs pathogènes tels que le tabac, l'hypertension artérielle, le diabète, le stress oxydatif, l'infection, les forces mécaniques de cisaillement et l'inflammation subclinique chronique [137]. Ces insultes répétées mènent à la perte de l'homéostasie vasculaire, se caractérisant par un déséquilibre des effets vasodilatateurs / vasoconstricteurs, à la libération de dérivés toxiques de l'oxygène (*reactive oxygen species*; ROS) par diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) et à l'expression de cytokines inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF). L'augmentation de la perméabilité endothéliale et la dysfonction cellulaire permettent aux particules LDL-C de s'infiltrer et de s'accumuler en abondance sous forme de gouttelettes lipidiques extracellulaires dans les couches de cellules musculaires lisses [138, 139]. La région proximale d'une artère ou adjacente à un point d'embranchement / bifurcation sont

des sites de prédilection de l'arbre coronarien pour la formation d'une plaque d'athérome de par la turbulence du flot et les faibles forces de cisaillement [138-140].

### 2.2.2. Recrutement, adhésion et transmigration des leucocytes

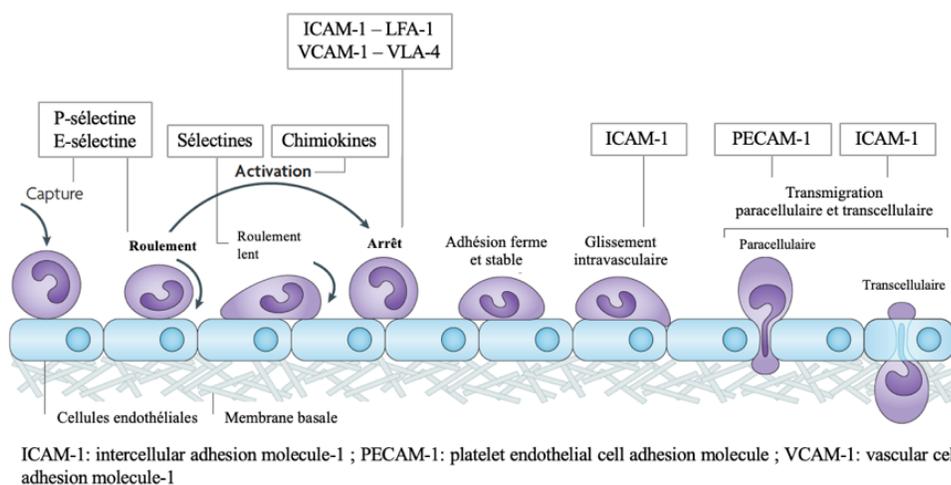
L'inflammation a pour fonction de recruter et d'activer les leucocytes au niveau de l'endothélium lésé et d'assurer leur extravasation vers l'espace interstitiel. Au cours de la réponse inflammatoire, il se produit une vasodilatation des artères, entraînant localement une augmentation du volume sanguin et de la pression exercée sur la paroi artérielle, de même qu'un ralentissement du débit sanguin (stase). La diminution des forces de cisaillement mène à l'accumulation locale des leucocytes, phénomène appelé *marginalisation*. Les leucocytes s'accumulent et roulent à la surface de l'endothélium, puis adhèrent faiblement aux molécules d'adhésions cellulaires (CAM) exprimées à la surface de l'endothélium, phénomène appelé *roulement* (Figure 24) [141]. L'augmentation de l'expression des CAM par divers stimuli permet l'adhérence ferme des leucocytes à la paroi, menant à la transmigration à travers l'endothélium via l'interaction avec des protéines jonctionnelles telles que PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), phénomène appelé *diapédèse* [141].



ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1 ; IL-1: interleukine-1; PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule ; TNF: tumor-necrosis factor

**Figure 24.** Processus d'extravasation des leucocytes circulants. Adaptée de [141].

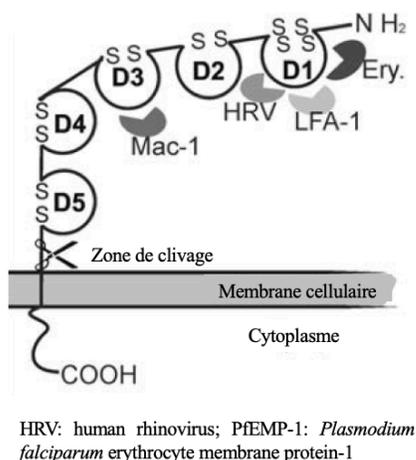
Plusieurs médiateurs de l'inflammation sont impliqués dans l'extravasation des leucocytes circulants. Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induisent l'expression de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) à la surface des cellules endothéliales [133, 141], molécules d'adhésion cellulaire de la famille des immunoglobulines servant de ligands aux intégrines exprimées à la surface des leucocytes (ICAM-1, ligand des intégrines LFA-1 et Mac-1; VCAM-1, ligand de l'intégrine VLA-4) [141, 142]. D'autres CAM sont impliquées dans le recrutement de leucocytes dans l'intima, dont P- et E-sélectine (Figure 25) [139, 142, 143]. VCAM-1 module l'adhésion sélective de monocytes et lymphocytes T à l'endothélium vasculaire, ce qui permet la migration tardive des leucocytes vers l'espace interstitiel suivant un gradient de concentration chimiotactique régulé par de nombreuses chimiokines et cytokines telles que CCL2 (*chemokine ligand 2*) / MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) [138, 139, 141]. L'interleukine-8 (IL-8) et les chimiokines induites par l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) contribuent également au recrutement des leucocytes vers l'intima [138-141, 144, 145]. Les LDL modifiées stimulent également l'expression des molécules d'adhésion de l'endothélium et l'expression des chimiokines favorisant l'activation, le recrutement et la migration de diverses cellules immunitaires vers l'intima tels que les monocytes, les mastocytes, les neutrophiles et les cellules dendritiques et les lymphocytes T, B et NK [138, 146-149].



**Figure 25.** Molécules d'adhésion cellulaires impliquées dans la transmigration des leucocytes circulants. Adaptée de [142].

### 2.2.2.1. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1

ICAM-1 ou CD54 est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) [150]. Encodée par le gène *ICAM1* situé sur le chromosome 19 chez l'humain, la protéine est très faiblement exprimée à la surface de l'endothélium sain et des leucocytes, mais est surexprimée en présence de dysfonction endothéliale et stimuli proinflammatoires. Sa structure est caractérisée par une forte glycosylation et une région extracellulaire composée de cinq domaines Ig reliés par des ponts disulfures [150]. Plusieurs ligands ont été identifiés, dont l'intégrine membranaire  $\beta 2$  LFA-1 et Mac-1 à la surface des leucocytes [151, 152], le fibrinogène, le rhinovirus humain et les érythrocytes infectés par le *Plasmodium falciparum* (Figure 26) [150].



**Figure 26.** Schéma de ICAM-1. Cinq domaines Ig (D1-D5) avec ligands LFA-1, Mac-1, *Plasmodium falciparum* erythrocytes membrane protein-1 (PfEMP-1) et rhinovirus humain (HRV). Adaptée de [150].

ICAM-1 est une molécule d'adhésion intercellulaire impliquée dans l'adhésion ferme et la migration endothéliale des leucocytes circulants aux sites de l'inflammation, de même que dans les interactions entre les cellules présentatrices d'antigène (APC) et les lymphocytes T [150, 153]. En addition, ICAM-1 induit l'activation de signaux intracellulaires via différents médiateurs (p38, Rho), menant à

la réorganisation du cytosquelette cellulaire nécessaire à la diapédèse des leucocytes, et à l'activation de cascades proinflammatoires qui perpétuent la réponse inflammatoire [150]. ICAM-1 est exprimée à la surface de différents types cellulaires (l'endothélium, macrophages et cellules musculaires lisses) au sein d'artères humaines et d'animaux athérosclérotiques à des stades précoces de l'athérogenèse [153-158] et semble impliquée dans la progression des plaques d'athérome chez la souris [159, 160]. Certains travaux ont démontré un facteur protecteur contre le développement de l'athérosclérose chez des souris génétiquement modifiées *Ldlr*<sup>-/-</sup> déficientes en VCAM-1 [160] et apoE<sup>-/-</sup> déficientes en ICAM-1 [161-163]. Cependant, une étude publiée par Cybulsky et al. [160] n'a pu démontrer l'implication de ICAM-1 dans l'initiation de l'athérosclérose chez un modèle de souris *ICAM-1*<sup>-/-</sup>/*Ldlr*<sup>-/-</sup>. Ces résultats divergents pourraient en partie s'expliquer par les différences dans la méthodologie expérimentale employée entre ces études : (1) différences dans l'initiation et la progression de l'athérogenèse selon le modèle murin à l'étude (apoE<sup>-/-</sup> vs. *Ldlr*<sup>-/-</sup>); (2) variabilité des niveaux de ICAM-1 circulants selon l'exon muté de *ICAM-1* [164, 165] et; (3) la durée de la diète hypercholestérolémique chez les animaux sous protocole.

Une forme soluble de ICAM-1 (sICAM-1), consistant en la forme clivée de la molécule transmembranaire ICAM-1, a été identifiée dans le sérum de patients avec maladie cardiovasculaire, néoplasie et maladies auto-immunes [150]. Plusieurs grandes études épidémiologiques ont démontré que des niveaux élevés de sICAM-1 chez des sujets sains augmentaient le risque de développer une MCAS, une maladie vasculaire périphérique, de l'athérosclérose carotidienne et AVC [166-169]. Le potentiel de sICAM-1 comme marqueur pronostic a également été investigué et plusieurs travaux ont établi une corrélation entre les niveaux de sICAM-1 et la sévérité de la maladie [159]. Chez des patients avec coronaropathie chronique documentée, il a été démontré que les taux sériques élevés de sICAM-1 étaient associés à un risque significativement augmenté de décès cardiovasculaire [170, 171], d'IDM [171] de même que d'AVC ischémique, reflétant une augmentation de l'activité inflammatoire [172].

### 2.2.3. Formation des cellules spumeuses et des stries lipidiques

Au sein de la région sous-endothéliale, les monocytes vont se différencier en macrophages sous la régulation du MCSF (*macrophage colony-stimulating factor*) et exprimer en surface divers récepteurs éboueurs, dont le SRA (*scavenger receptor class A*) et le CD36, permettant d'internaliser et de dégrader les molécules LDL modifiées par oxydo-réduction (Figure 27) [139, 173-175]. Les macrophages engorgés de particules de LDL oxydés (oxLDL), dont le contenu est riche en esters de cholestérol, vont se différencier en cellules spumeuses (stade I), générant la plaque d'athérosclérose précoce appelée stries lipidiques ou xanthome intimal (stade II) [138, 176].

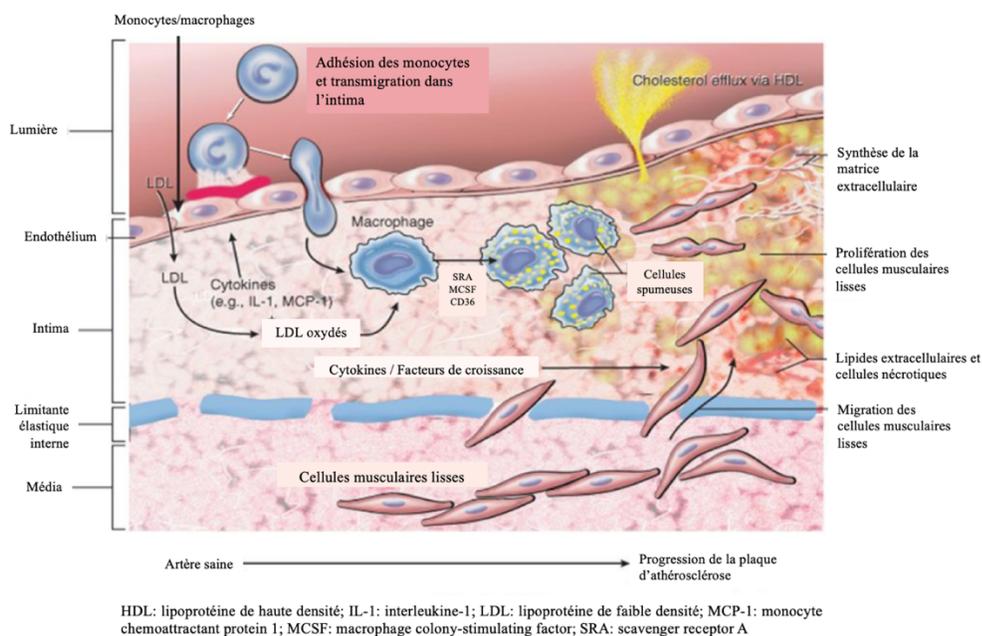


Figure 27. Initiation et progression de la plaque d'athérosclérose. Adaptée de [141].

## 2.3. Évolution de la plaque d'athérosclérose

### 2.3.1. Progression de la plaque d'athérosclérose et remodelage positif

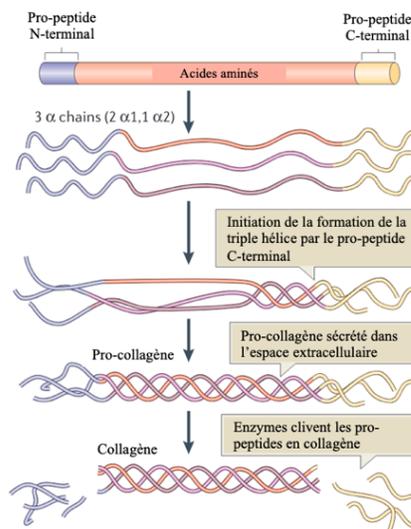
L'évolution des stries lipidiques vers une plaque complexe résulte de la sécrétion de cytokines et facteurs de croissances par les cellules spumeuses, dont PDGF (*platelet-*

*derived growth factor*) et TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), menant à la migration de cellules musculaires lisses provenant de la média vers l'intima (Figure 27) [138, 139]. Celles-ci vont se répliquer et synthétiser des protéines de la matrice extracellulaire, dont des protéoglycans, collagène et l'élastine, résultant en l'épaississement pathologique de l'intima (stade III) [139, 176, 177]. Les cellules musculaires lisses sont les principaux constituants du tissu conjonctif au sein de l'intima pathologique et produisent une chape fibreuse, matrice riche en collagène type III, qui confère la stabilité de la plaque [138]. L'accumulation de cellules dans l'intima et l'élaboration d'une matrice extracellulaire complexe, résultant en la croissance de la plaque, sont accommodées par un phénomène d'expansion externe de la paroi artérielle, soit le phénomène de remodelage positif ou *effet Glagov* [178]. Ce phénomène compensatoire de la réduction de la lumière interne de l'artère est généré par la rupture de la limitante élastique interne, permettant l'expansion des phénomènes athérosclérotiques vers la média [179].

#### 2.3.1.1. Collagène et la chape fibreuse

La famille de collagènes comprend 19 types différents, dont la structure protéique est caractérisée par trois chaînes polypeptidiques (chaînes alpha) assemblées en triple hélices [180-182] (Figure 28). Constituant majeur de la matrice extracellulaire, le collagène fibrillaire comprend les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII. Les collagènes types I et III procurent une force mécanique permettant la distension de la paroi vasculaire. Le collagène type IV se retrouve dans la membrane basale de l'endothélium [183]. Durant la progression de l'athérosclérose, les cellules musculaires lisses quiescentes induisent la prolifération et la synthèse de la matrice extracellulaire [184]. Les plaques d'athérome humaines sont composées principalement de collagène interstitiel de types I et III, dont le type I constitue environ les deux tiers du contenu total en collagène [185, 186]. Le contenu en collagène type V augmente dans les stades avancés de l'athérogenèse [187] et des dépôts de collagène type IV sont fréquemment présents dans les régions à proximité de la chape fibreuse [185, 187]. L'accumulation importante de collagène représente environ 60% du contenu total en protéines dans la plaque,

contribuant à la croissance de la plaque et au rétrécissement de la lumière interne de l'artère [188]. La synthèse du collagène type I et III par les cellules musculaires lisses est localisée dans l'intima [183]. Bien qu'il n'ait jamais été identifié dans les artères humaines saines, la présence de pro-collagène type I tant dans les lésions précoces et stries lipidiques que les plaques fibro-lipidiques et fibreuses suggère que la synthèse de collagène survient précocement dans le processus d'athérogenèse [189]. Le collagène module la fonction des macrophages, stimule la prolifération, la migration et la réponse aux facteurs de croissance des cellules musculaires lisses, et stimule la formation de thrombus [181, 190, 191]. De surcroît, le collagène fibrillaire contribue au maintien de l'intégrité structurelle de la plaque, lui conférant une stabilité mécanique. Ainsi, un déficit en collagène fibrillaire contribue à l'affaiblissement et à la vulnérabilité de la plaque d'athérome [189].

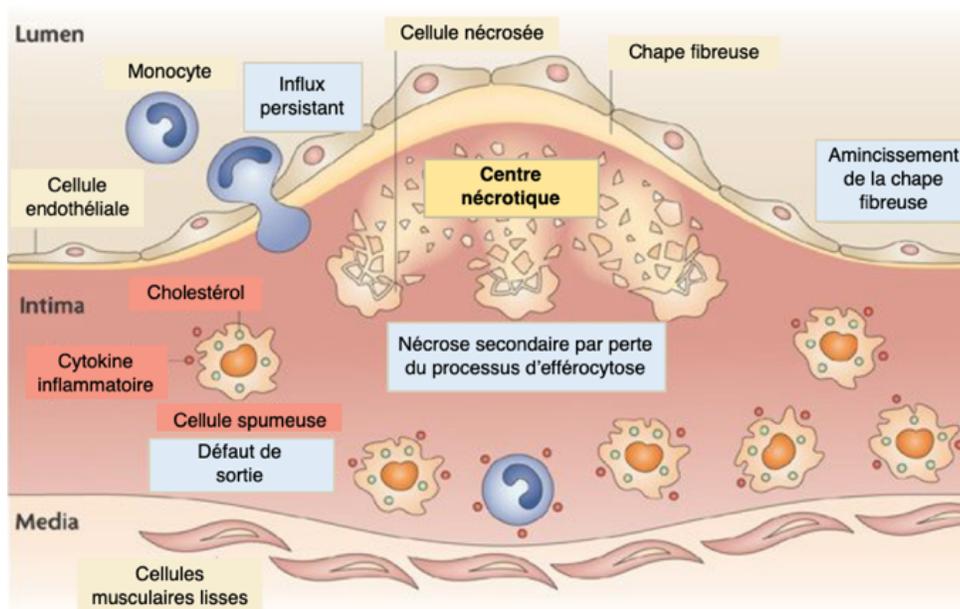


**Figure 28.** Structure du collagène fibrillaire. Constitué de trois chaînes alpha ( $\alpha$ ) assemblées en triple hélices. Adaptée de [182].

### 2.3.2. Le centre nécrotique

L'accumulation de cellules inflammatoires et de lipides au sein de la plaque d'athérosclérose mène à la formation d'un noyau riche en cholestérol, appelé centre nécrotique, localisé à la portion centrale de la lésion [133, 139]. Les macrophages et cellules musculaires lisses entrent en mort cellulaire par apoptose et celles-ci sont

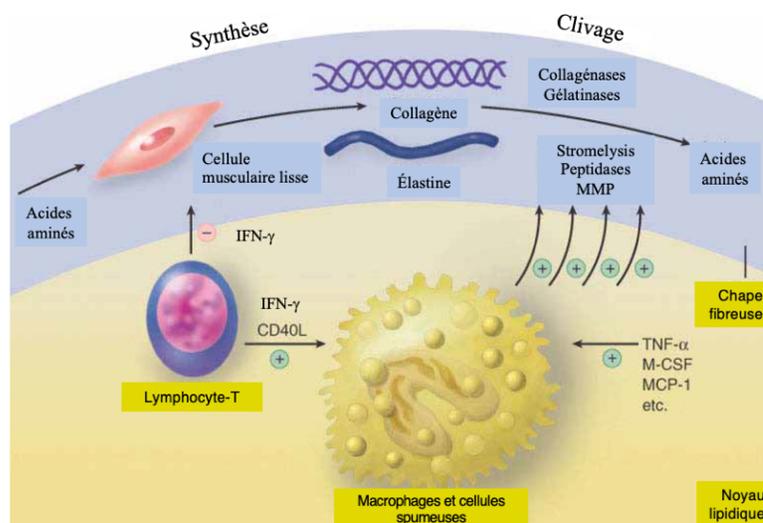
promptement retirées du noyau par un sous-type de macrophages (M2) [192]. La phagocytose excessive de ces cellules par les macrophages mène à la dérégulation de leur réticulum endoplasmique cellulaire et perte subséquente du processus d'efférocytose, dont l'accumulation de résidus apoptotiques contribue à la croissance du centre nécrotique (Figure 29) [192, 193]. Ainsi, le noyau lipidique devient hypocellulaire, avasculaire, dénué d'un support de collagène, générant ainsi un milieu hypoxique qui stimule l'infiltration subséquente de cellules inflammatoires, de même que la néovascularisation [194-196]. De plus, les macrophages apoptotiques vont exprimer le gène encodant le facteur tissulaire procoagulant, par stimulation via le médiateur CD54 / CD40 ligand, rendant le centre nécrotique un site propice à la formation de thrombus [133, 139]. La confluence des gouttelettes lipidiques, de même que l'apoptose et la nécrose secondaire des cellules spumeuses et des cellules musculaires lisses au sein du centre nécrotique, en présence de macrophages et lymphocytes T à la surface du noyau nécrotique, forment la plaque d'athérome (stade IV) [176]. La relâche d'esters de cholestérol et lipides oxydés par les macrophages en mort cellulaire perpétue un état proinflammatoire contribuant à la formation d'une plaque d'athérome complexe et instable [138, 173].



**Figure 29.** Formation du centre nécrotique d'une plaque d'athérosclérose. Adaptée de [192].

### 2.3.3. La chape fibreuse

Une matrice dense en collagène et protéoglycans forme la chape fibreuse (stade V) [176]. Celle-ci a pour rôle d'empêcher tous contacts entre le noyau lipidique et les constituants du milieu sanguin. Cette couche de tissus conjonctifs, dont l'intégrité confère en partie la stabilité de la plaque, dispose d'une force de traction provenant de fibres de collagène de type III [184, 185]. Certaines cytokines proinflammatoires sécrétées par les lymphocytes T, dont l'IFN- $\gamma$ , peuvent inhiber la production de collagène par les cellules musculaires lisses, mettant en péril l'intégrité de cette matrice par amincissement de la chape fibreuse (Figure 30) [185, 197, 198]. De plus, IFN- $\gamma$  inhibe directement la prolifération de cellules musculaires lisses et stimule l'apoptose et la nécrose, menant de surcroît à une réduction de la densité en collagène [199].



CD40L: CD40-ligand; IFN- $\gamma$ : interféron-gamma; MCP-1:macrophage chemoattractant protein-1; MCSF: macrophage colony-stimulating factor; MMP: métalloprotéinases; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

**Figure 30.** Métabolisme du collagène et de l'élastine dans la chape fibreuse d'une plaque d'athérosclérose. Adaptée de [212].

### 2.3.4. Les calcifications

Les calcifications focales sont très fréquemment observées dans les lésions athérosclérotiques avancées et augmentent avec l'âge [200]. La minéralisation de l'intima

est l'un des aspects des lésions athérosclérotiques avancées et se caractérise par l'accumulation de cristaux d'hydroxyapatite près du centre nécrotique et des infiltrats de cellules inflammatoires [201]. L'accumulation de granules de calcium au sein du centre nécrotique et de la matrice extracellulaire peut évoluer jusqu'à la métaplasie osseuse, menant à une calcification dense de la plaque [200, 202]. Les mécanismes de calcification artérielle sont mal élucidés, mais sembleraient régir par l'ostéogenèse et la perte d'inhibiteurs de la déminéralisation impliquant l'interaction de OPG (*osteoprotegerin*) et du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANKL) [203].

### 2.3.5. Déterminants de l'instabilité de la plaque

De nombreux facteurs et conditions jouent un rôle dans la pathophysiologie de l'instabilité de la plaque d'athérosclérose et du syndrome coronarien aigu.

#### 2.3.5.1. Métalloprotéinases

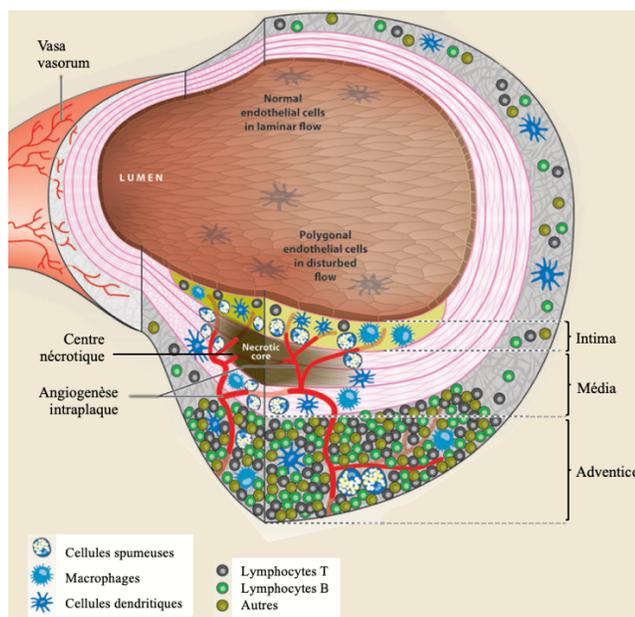
Les cellules spumeuses sécrètent des collagénases interstitielles, les métalloprotéinases (MMP), qui contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire et à l'affaiblissement de la chape fibreuse. Des études ont démontré que les MMP-1 (collagénase-1), MMP-8 (collagénase neutrophile) et MMP-13 sécrétées par les macrophages sont surexprimées au sein de plaques athéromateuses chez l'humain et induisent le clivage du collagène fibrillaire de type I [185, 204-208]. De plus, il a été démontré que les CD40 exprimé par les lymphocytes T, son ligand CD154, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et MCSF stimulent la production de collagénases par les macrophages *in vitro* (Figure 30) [209-212]. Exprimée par les cellules musculaires lisses, les cellules spumeuses, les cellules endothéliales et les leucocytes, la protéine MMP-1 est localisée principalement au niveau du bord latéral de la chape fibreuse, région la plus abondamment infiltrée par les cellules spumeuses, à la base du noyau lipidique [204]. MMP-8 est également retrouvée à proximité des types cellulaires présents dans les plaques d'athérome humaines [206].

D'autres membres de la famille des métalloprotéinases peuvent catalyser la dégradation de fragments de collagènes et de l'élastine, dont les collagénases interstitielles, gélatinases (MMP-2, MMP-9) et stromelysine (MMP-3), toutes exprimées par les cellules musculaires lisses, lymphocytes T et macrophages au sein de la plaque d'athérome [211, 212]. Les gélatinases dégradent les composantes de la membrane basale telles que le collagène type IV, suggérant la possibilité qu'elles soient impliquées dans l'érosion de la plaque [213].

### 2.3.5.2. Angiogenèse et hémorragie intraplaque

La vasa vasorum est un réseau spécialisé de microvaisseaux localisé dans l'adventice et servant de source extrinsèque de nutriments. En présence d'épaississement pathologique de l'intima, les couches internes de la paroi vasculaire n'ont plus d'apports en nutriments et oxygène, générant un environnement hypoxique stimulant l'angiogenèse, soit la formation de néovaisseaux capillaires (Figure 31) [214]. L'hyperplasie de la vasa vasorum adventitielle survient dans les phases précoces de l'athérogenèse, sous l'effet du stimulateur de l'angiogenèse VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) et du facteur induisant l'hypoxie (*hypoxia inducible factor*, HIF-1), alors que l'expansion de microvaisseaux vers la média et l'intima survient à des stades avancés de l'athérosclérose [215-217]. Les nouveaux microvaisseaux, exprimant les molécules d'adhésion cellulaire VCAM-1 et ICAM-1, sont friables et perméables, donnant lieu à l'extravasation locale de macrophages, de lymphocytes T et d'érythrocytes, contribuant ainsi à l'élargissement du centre nécrotique et à la formation récurrente de zones d'hémorragies intraplaques [177, 195, 215-218]. L'hémorragie intraplaque peut également survenir lors de fissuration à des sites de fragilisation de la chape fibreuse, permettant l'accumulation de sang dans le centre nécrotique et à l'expansion rapide de la plaque [218-220]. La relâche d'hémoglobine et de lipides membranaires par les érythrocytes contribue à maintenir l'inflammation locale, le stress oxydatif et à l'élargissement subséquente du centre nécrotique riche en lipides [139]. La thrombine et le facteur de croissance PDGF

stimulent directement la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, de même que la formation de thrombus intraplaque [139, 221]. Ainsi, l'angiogenèse et l'inflammation coexistent souvent et pourraient jouer un rôle dans la progression rapide de la plaque [195, 196, 219].



**Figure 31.** Schématisation d'une plaque d'athérosclérose complexe. Adaptée de [135].

### 2.3.5.3. Forces mécaniques

L'altération des forces de traction mécaniques exercées sur la plaque, de même que le vasospasme et les forces de cisaillement, semblent impliquée dans la rupture de plaque. Une configuration anormale d'une plaque riche en lipides crée une répartition inégale de la tension circonférentielle exercée sur une région de la paroi vasculaire riche en macrophages et dépourvue de support de collagène sous-jacent [222]. Le risque de fissuration est plus élevé lorsque la chape fibreuse est amincie ou d'épaisseur inégale, de même qu'en l'absence de sténose de haut grade [223, 224]. Une modélisation informatique a pu démontrer qu'une distribution excentrique du noyau lipidique crée une répartition inégale de la tension intravasculaire circonférentielle exercée vers les extrémités latérales de la chape fibreuse, zone de fragilisation dénuée

de support en collagène et riche en cellules inflammatoires, représentant le site de rupture le plus fréquemment observé lors des études autopsiques [223, 225-227].

## **2.4. Complications de l'athérosclérose**

### **2.4.1. Sténose coronaire et ischémie myocardique**

Durant l'athérogenèse, l'artère coronaire subit un remodelage par expansion de la limitante élastique externe afin d'éviter la protrusion de la plaque dans la lumière interne du vaisseau (remodelage positif). Au-delà d'une sténose de 40% en sévérité, le diamètre interne de l'artère est diminué en relation étroite avec le degré de sévérité de la sténose [178]. La progression subséquente de la plaque d'athérome survient par l'expansion (remodelage positif) ou rétrécissement de la limitante élastique externe au site de la lésion (remodelage restrictif/négatif), ou par combinaison des 2 processus [178, 228]. Le remodelage positif est fréquemment observé en présence de plaques fibroathéromateuses, instables, et le degré d'expansion du vaisseau est corrélé positivement à l'inflammation et à la taille du centre nécrotique [229, 230]. En contrepartie, les segments artériels en constriction contiennent généralement des lésions riches en tissus fibreux, reflétant une maladie coronarienne stable [230]. Ainsi, les changements de la taille de l'artère sont reliés à la progression ou la régression de la maladie athérosclérotique [231].

Lorsque la sténose progresse >50% en sévérité, la baisse de pression de perfusion en aval de la sténose, de même que les résistances vasculaires, augmentent de façon exponentielle en fonction du rétrécissement progressif de la surface interne du vaisseau sténotique, résultant en la diminution de la perfusion coronarienne maximale et en la survenue d'ischémie myocardique à l'effort [10, 232]. De par les mécanismes d'autorégulation, le flot sanguin coronarien au repos demeure inchangé jusqu'à l'atteinte d'une sténose d'au moins 85% en sévérité [10, 232]. Ce phénomène résulte d'une réduction graduelle de la capacité de vasodilatation coronarienne en réponse à une diminution du flot, reflétant l'altération de la réserve coronarienne. Suivant l'étude de

Gould *et al.* publiée en 1974, il fut déterminé qu'une sténose  $\geq 70\%$  en sévérité correspond à la valeur anatomique seuil pour procéder à la revascularisation coronaire [232]. Bien que la détection d'ischémie myocardique soit indicative d'une sténose coronaire épicaudique significative [233], l'évaluation angiographique seule ne permet pas d'évaluer avec précision l'impact hémodynamique d'une sténose coronaire [70, 234, 235]. Ces évidences ont mené au développement de techniques invasives basées sur la physiologie coronarienne comme substituts à l'évaluation non invasive d'ischémie myocardique inductible [236, 237] et permettant d'évaluer l'impact fonctionnel de la coronaropathie directement au laboratoire de cathétérisme cardiaque. L'angioplastie coronaire par guidance de la réserve du débit fractionnaire (*fractional flow reserve*, FFR) a démontré des bénéfices cliniques chez les patients avec coronaropathie stable [234, 236, 237].

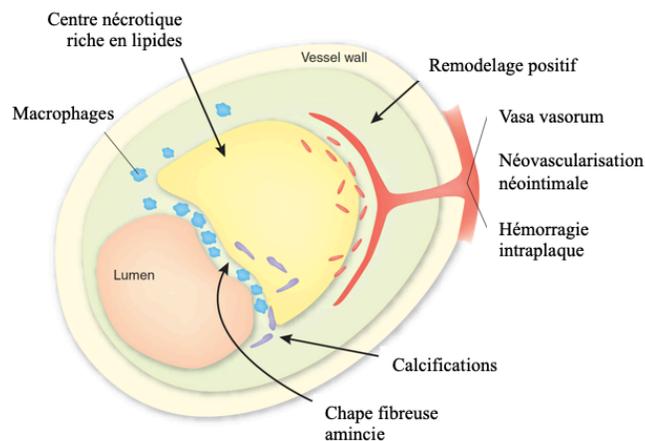
#### 2.4.2. Rupture de plaque et thrombose

En 1966, l'étude autopsique de 17 cas de thromboses coronariennes a révélé que la rupture d'une plaque d'athérosclérose était la cause immédiate de la formation d'un thrombus endoluminal. Trois types de plaques instables ont par la suite été identifiées et associées à de potentiels agents causals de processus thrombotiques : la rupture de plaque (55-65%), l'érosion superficielle (30-35%) et les nodules calcifiés (2-7%) [220, 238-240]. La rupture d'une plaque peut survenir spontanément ou par stimulation transitoire du système adrénergique par le biais de l'activité physique, la colère, le stress, l'anxiété, les changements climatiques, l'infection ou la prise de cocaïne / stimulants [241]. La rupture de la chape fibreuse permet aux substances sanguines circulantes d'entrer en contact direct avec les composantes hautement thrombogéniques du centre nécrotique, résultant en l'activation et l'agrégation plaquettaire (hémostase primaire) [139, 242, 243]. L'activation de la cascade de coagulation par le facteur tissulaire VII (hémostase secondaire) mène à la formation d'un thrombus mural limitant le flot sanguin dans l'artère. La relâche subséquente du facteur de von Willebrand par les plaquettes activées et le clivage du fibrinogène en monomères de fibrines mène à la formation d'un thrombus occlusif blanc (riche en plaquettes) ou rouge (riche en érythrocytes) [220, 243, 244]. Le facteur inhibiteur

du plasminogène-1 (PAI-1) inhibe les activateurs de plasminogène et les urokinases, favorisant ainsi l'accumulation de thrombi au sein de la lumière de l'artère [133, 139]. L'embolisation distale de thrombi et de lipides peut survenir au site d'une plaque rompue lors d'un IDM, menant à l'occlusion de petites artères de la microcirculation, phénomène appelé « *no-reflow* » [139].

#### 2.4.2.1. Concept de la plaque vulnérable

En 1989, Muller et ses collègues proposaient le concept de *plaque vulnérable* pour désigner une sténose non significative subissant des modifications aiguës susceptibles d'induire la rupture ou érosion soudaine de la plaque, d'une thrombose aiguë et subséquemment un IDM [245]. La rupture d'une plaque survient à partir d'une lésion fibroathéromateuse caractérisée par un large centre nécrotique (> 25% de l'aire de la plaque) arborant une chape fibreuse amincie < 65 µm d'épaisseur, abondamment infiltrée par des macrophages et lymphocytes ; cette morphologie très distincte fut désignée « *thin-cap fibroatheroma* » ou TCFA (Figure 32) [176, 246]. Cette plaque de stade avancée est considérée comme la lésion précurseur à la survenue d'une rupture. Bien que similaire, le TCFA diffère d'une plaque rompue de par la présence d'un centre nécrotique moins volumineux, d'une chape fibreuse moins infiltrée par les macrophages et d'une plaque moins riche en lipides et peu sténosante [247].



**Figure 32.** Schéma de la plaque vulnérable, également appelée la plaque « popcorn ». Adaptée de [248].

### 2.4.3. Nodule calcifié

La présence de nodules calcifiés induit une brèche à la surface de l'intima, menant à la formation de thrombus surimposés. Bien qu'elle soit la cause la moins fréquente de thrombose endoluminale, la prévalence est plus élevée chez les hommes âgés ayant des artères coronaires tortueuses, de même que chez les diabétiques et les insuffisants rénaux chroniques. Le mécanisme pathophysiologique entourant la formation de nodules calcifiés demeure à ce jour inconnu [200, 227].

### 2.4.4. Érosion de plaque

L'érosion d'une plaque est la seconde cause la plus fréquente de thrombose coronarienne. Les principales caractéristiques de cette plaque sont la présence d'une chape fibreuse épaissie et riche en cellules musculaires lisses, de même qu'une absence d'endothélium de surface sous le thrombus. Il y a absence de centre nécrotique, très peu de cellules inflammatoires, présence de remodelage négatif/constrictif avec accumulation de protéoglycans (versican) et d'acide hyaluronique (hyaluronan) au sein de la matrice extracellulaire [200, 227].

## 2.5. Guérison de la plaque

L'étude de coupes histologiques a révélé la présence de multiples couches inégales de collagènes type I et III aux sites de rupture de plaques sténosantes de haut grade, suggérant l'avènement de fissures subcliniques / silencieuses pouvant contribuer de manière significative à l'augmentation du calibre de la plaque [133, 139]. La présence d'une fissure permet l'entrée de composantes du sang dans la plaque, menant à la formation et l'incorporation de thrombus, prolifération de cellules musculaires lisses et dépôts de nouvelles fibres de collagène initiées par la relâche de PDGF et TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) [133, 227, 249]. Ainsi, le phénomène de guérison répété d'une plaque serait le reflet du développement phasique plutôt que linéaire de sténoses sévères chroniques [250-253].

### **3. Diverses modalités d'imagerie invasives de la plaque d'athérosclérose coronarienne**

#### **3.1. Modalités d'imagerie invasives utilisées en clinique**

Bien qu'elle soit l'approche conventionnelle pour l'évaluation des sténoses coronariennes épicaudiques, l'angiographie conventionnelle ne fournit qu'une perspective planaire en 2-dimensions (2D) de la lumière du vaisseau et ne permet pas d'évaluer directement la paroi artérielle [254]. Depuis plus d'une décennie, de nouvelles technologies d'imagerie intracoronarienne ont été développées afin de permettre la visualisation directe et détaillée de la structure endoluminale et la caractérisation de la plaque d'athérome coronarienne *in vivo*. Chacune de ces modalités d'imagerie possède des fonctionnalités qui lui sont propres et qui permettent d'obtenir des informations précises, et ce, tout en ayant des limitations inhérentes selon la technologie exploitée.

##### **3.1.1. Ultrasonographie intravasculaire (IVUS)**

L'ultrasonographie intravasculaire (IVUS, *intravascular ultrasonography*) est une modalité d'imagerie tomographique intravasculaire qui produit des images en coupes transversales de la lumière interne et de la paroi du vaisseau, utilisant une sonde émettant des ultrasons de fréquences comprises entre 20 à 60 MHz [60]. Le signal ultrasonique réfléchi par les structures composant la paroi artérielle est utilisé pour générer une image en niveaux de gris (Figure 33). Les résolutions axiale et latérale de cathéters à haute résolution peuvent atteindre 100-150  $\mu\text{m}$ . L'interface entre la lumière du vaisseau et l'intima, ainsi que la limitante élastique interne, sont facilement visualisées par IVUS et permettent de mesurer la surface délimitée par la lumière du vaisseau, la surface totale occupée par l'intima et la média et la surface délimitée par la limitante élastique externe [60, 72, 227, 251-253, 255]. Les régions calcifiées sont échogènes et produisent une zone ombragée des régions sous-jacentes, alors que les régions fibreuses et riches en lipides sont respectivement hyper- ou hypoéchogènes.

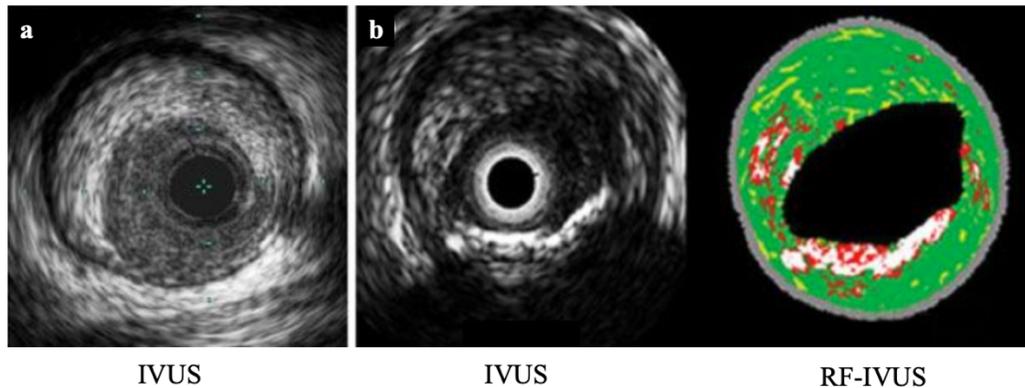
Ainsi, l'IVUS permet d'évaluer la sévérité d'une sténose, le fardeau lipidique ou « *plaque burden* », le remodelage, les calcifications et la présence de thrombus [255-257]. La faible résolution de l'IVUS limite toutefois la visualisation de la chape fibreuse, la différenciation entre les zones calcifiées et zones lipidiques, la détection d'érosion et rupture de la plaque [200, 255].

L'IVUS est devenue l'étalon-or dans les études cliniques évaluant l'efficacité d'un nouvel agent thérapeutique sur la régression de la plaque d'athérosclérose [60]. La première étude prospective randomisée, REVERSAL [258], a démontré que l'atorvastatine (Lipitor®, Pfizer, NY, E-U) 80 mg/jour pouvait freiner, voire réduire la progression de l'athérosclérose. Ces trouvailles ont été démontrées dans d'autres études randomisées subséquentes avec statines, soient les études ASTEROID [259] et SATURN [260]. L'IVUS fut également utilisé pour évaluer d'autres approches thérapeutiques innovantes telles que les inhibiteurs de l'*acylcholesterol acyltransferase* (ACAT), les inhibiteurs du *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) et l'antioxydant succinobucol (AGI-1067) [256].

### 3.1.2. Ultrasonographie intravasculaire par radiofréquence (RF-IVUS)

L'IVUS par radiofréquence (RF-IVUS) permet de mieux caractériser la composition de la plaque et de dichotomiser 4 différentes composantes de la plaque : fibreuse, fibro-lipidique, centre nécrotique et calcifications denses (Figure 33). Par comparaison à des spécimens histologiques d'artères coronaires humaines, RF-IVUS est dotée d'une sensibilité, d'une spécificité et d'une valeur prédictive positive entre 80%-92% pour l'identification des 4 composantes de la plaque [255, 261-63]. Une définition de la TCFA détectée par IVUS (IDTCFA) fut proposée afin d'évaluer l'incidence de la plaque vulnérable *in vivo* par RF-IVUS et est corrélée aux observations pathologiques *ex vivo*. Puisque la faible résolution ne permet pas de visualiser la chape fibreuse, IDTCFA se définit comme une plaque ayant une aire  $\geq 40\%$  du volume de la paroi (% *atheroma volume*) observée sur 3 images consécutives et un centre nécrotique  $\geq 10\%$  du volume de la plaque [264].

L'IVUS par radiofréquence demeure avec plusieurs limitations, dont la faible résolution spatiale entre 150-250  $\mu\text{m}$ , rendant ainsi cette modalité incapable d'identifier les plaques assujetties à la rupture ou à distinguer le noyau lipidique du centre nécrotique [265]. Compte tenu que l'acquisition des images est déclenchée à l'onde R du signal électrocardiographique, des variabilités dans la fréquence cardiaque peut résulter en la présence d'artéfacts et biais pouvant réduire la précision des estimations volumétriques des différents sous-types de la plaque en présence [266]. De surcroît, les algorithmes mathématiques actuels de RF-IVUS faillent à distinguer le centre nécrotique des calcifications, résultant parfois en une analyse erronée des types de plaques imagées [261].



**Figure 33.** Images obtenues par différentes techniques d'imagerie IVUS. (a) Image IVUS en coupe transversale d'une artère coronaire; (b) Image RF-IVUS en coupe transversale d'une artère coronaire avec code de couleur distinguant les 4 sous-types histologiques : fibrose (vert), fibro-lipidique (vert pâle), centre nécrotique (rouge) et calcifications denses (blanc). IVUS, intravascular ultrasonography; VH, virtual histology. Adaptée de [266].

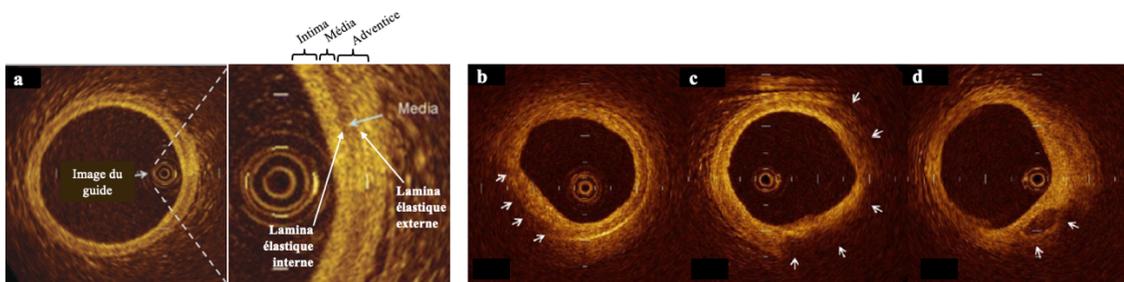
Étant l'un des biomarqueurs de la progression de la plaque, le remodelage vasculaire peut être évalué de manière fiable par IVUS / RF-IVUS de par la capacité de cet outil à visualiser l'ensemble de la paroi vasculaire [178, 179]. Au cours de la dernière décennie, plusieurs études prospectives longitudinales ont réalisé de l'imagerie intravasculaire chez un total de 2157 patients en SCA et angine stable dans le but d'identifier les caractéristiques morphologiques de plaques peu ou non sténosantes (« non

*culprit* ») susceptibles de prédire la survenue d'évènements cardiovasculaires ultérieurs [267-270]. L'étude PROSPECT est une étude clinique prospective de 697 patients avec SCA qui ont subi de l'imagerie par RF-IVUS dans les 3 artères épicaudiques suivant l'ICP [267]. Après un suivi médian de 3,4 ans, l'étude a révélé que les plaques ayant engendré des évènements coronariens subséquents étaient peu sténosantes lors de l'angiographie initiale, mais présentaient un fardeau lipidique substantiel ( $\geq 70\%$  de l'aire de la plaque) avec une aire minimale de la lumière de l'artère (MLA)  $\leq 4 \text{ mm}^2$  et présentaient les caractéristiques du TCFA définies par RF-IVUS. La présence de 2 ou 3 de ces caractéristiques était associée à une probabilité de 10% à 18% d'induire un évènement subséquent à 3 ans. Les mêmes conclusions ont été obtenues dans les études VIVA, PREDICTION et ATHEROREMO-IVUS, et ce, malgré un nombre différent de patients recrutés dans ces études. Toutefois, l'incidence de complications majeures telles que le décès cardiovasculaire ou l'IDM était trop faible dans l'ensemble de ces études, ne permettant ainsi de conclure que les caractéristiques morphologiques identifiées de la plaque sont des prédicteurs indépendants du risque d'évènements cardiovasculaires majeurs.

### 3.1.3. Tomographie par cohérence optique (OCT)

La tomographie par cohérence optique (*optical coherence tomography* ou OCT) génère des images par mesure de l'intensité de la lumière infrarouge réfléchie sur différents constituants de la paroi artérielle, à une longueur d'onde de 1300 nm, offrant une résolution axiale nettement supérieure à l'IVUS ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ). Des études histopathologiques ont démontré la capacité de l'OCT à visualiser avec précision la rupture et l'érosion d'une plaque, l'hyperplasie intimale et la fibrose, les calcifications, les thrombus rouges et blancs, le pool lipidique et les paramètres du TCFA, soient la chape fibreuse amincie  $< 65\text{-}85 \mu\text{m}$  [271, 272], le centre nécrotique ayant un arc  $> 120^\circ$  et les macrophages (Figure 34) [60, 273-275]. Deux types de systèmes OCT existent : 1. *Time-domain* (TD-OCT), système de première génération; 2. *Optical frequency domain imaging* (OFDI), système de nouvelle génération. La différence principale entre ces systèmes est la capacité du système OFDI à

réaliser plusieurs coupes axiales (*A-lines*) à haute vitesse, permettant un recul automatisé plus rapide du cathéter durant l'injection de produit de contraste iodé nécessaire à la visualisation de la paroi artérielle. La principale limitation de cette modalité est la faible pénétrance des tissus (1-2.5 mm), basée principalement sur les propriétés optiques des tissus dont les lipides, limitant ainsi l'évaluation du diamètre véritable du vaisseau par absence de visualisation de la limitante élastique externe, de même que l'évaluation du fardeau lipidique, le remodelage / volume de la plaque et la caractérisation du contenu de la plaque [60, 275-278]. De plus, l'OCT ne peut produire des images à travers le sang, nécessitant une vidange du sang de la lumière durant l'acquisition d'images. Les limitations inhérentes de l'OCT freinent ainsi son utilisation comme outil d'imagerie des biomarqueurs de l'athérosclérose dans des études cliniques de développement d'agents anti-inflammatoires et hypolipémiants.



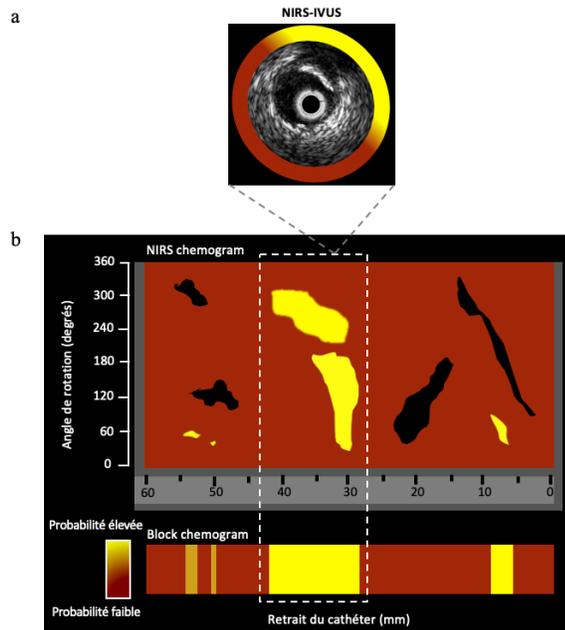
**Figure 34.** Images acquises par OCT. (a) Coupe transversale d'une artère coronaire saine démontrant 3 couches de la paroi artérielle, avec la média retrouvée entre la limitante élastique interne et externe; (b) coupes transversales d'artères coronaires athérosclérotiques avec plaque fibreuse (flèches); (c) plaque lipidique (flèches) et; (d) plaque calcifiée (flèches). OCT, optical coherence tomography. Adaptée de [278, 279].

### 3.1.4. Spectroscopie proche infrarouge (NIRS)

La spectroscopie proche infrarouge est une méthode spectroscopique utilisée dans la gamme infrarouge du spectre électromagnétique mesurant l'absorbance d'un tissu irradié par une source émettant à des longueurs d'ondes comprises entre 7800 et 2500 nm. Les propriétés d'absorption et de réflexion des différentes structures chimiques dans la paroi artérielle sont variables, permettant ainsi d'obtenir une empreinte spectroscopique unique [60]. L'analyse spectroscopique des données optiques génère un *chemogram*

représentant par des pixels de couleurs la présence et l'emplacement des plaques de noyaux de lipides (rouge = absence de lipide ; orange = probabilité intermédiaire d'une plaque lipidique ; jaune = haute probabilité d'un plaque lipidique) (Figure 35). Le LCBI (*lipid core burden index*) est une mesure métrique semi-quantitative basée sur la présence de pixels reflétant la probabilité de présence de plaques avec noyaux lipidiques (LCP – *lipid core plaque*) dans la région interrogée d'une artère (% pixels jaunes de la région d'intérêt x 10) [280, 281]. Le cathéter dispose également d'imagerie IVUS permettant d'évaluer des tissus ayant une épaisseur d'environ 2 mm. Toutefois, NIRS seul ne génère aucune image de la paroi du vaisseau et ne permet d'évaluer la profondeur du LCP. De plus, le cathéter génère de fausses lectures du LCP lorsqu'il y a présence de plaques fibroathéromateuses ayant une chape épaissie ou de petit calibre.

Des études *ex vivo* réalisées à partir d'artères coronaires humaines ont démontré la faisabilité du cathéter NIRS à détecter des LCP par exploitation d'un algorithme chimiométrique précis. Une forte corrélation fut démontrée entre l'algorithme NIRS, le LCBI et la classification histologique de la plaque d'athérosclérose [282]. Le LCP est une plaque fibroathéromateuse dont les caractéristiques histopathologiques incluent un noyau lipidique de circonférence > 60°, d'épaisseur > 200 µm et d'une chape fibreuse d'épaisseur moyenne ≤ 450 µm [280]. Le LCBI d'une région d'intérêt de 4 mm de longueur peut également être calculé et reflète le segment de la plaque le plus riche en lipides ( $\text{maxLCBI}_{4\text{mm}}$ ) [283]. Plusieurs études prospectives ont démontré que le  $\text{maxLCBI}_{4\text{mm}} > 400$  est un biomarqueur sensible et spécifique pour l'identification de plaques impliquées dans l'avènement d'un STEMI [284], de même qu'un NSTEMI et d'angine instable [285, 286]. Une seule étude prospective, ATHEROREMO-NIRS, a démontré l'association d'un LCBI au-dessus de la médiane de 43.0 et le risque augmenté de 4 fois d'évènements cardiovasculaires subséquents à 1 an de suivi [287]. D'autres études ont démontré l'association du LCP et LCBI dans l'identification de plaques à risque de complications péri-procédurales (le registre COLOR) [288], de même que l'effet des statines sur la réduction du LCP (l'étude YELLOW I) [289].



**Figure 35.** La combinaison de spectroscopie proche infrarouge (NIRS) à un cathéter IVUS. (a) Une image en coupe transversale acquise par IVUS avec chemogram circconférentiel; (b) le chemogram, représenté par une carte de couleurs générée par l'analyse spectroscopique de la paroi artérielle et indiquant la localisation et l'intensité du noyau lipidique dans la région d'intérêt. L'axe des X représente la position de retrait du cathéter dans l'artère (en mm) et l'axe des Y représente la position circconférentielle du cathéter (en degrés). Les images IVUS sont acquises simultanément et une coregistration avec les données NIRS est réalisée automatiquement par le système. Rouge = faible probabilité de LCP, Jaune = forte probabilité. IVUS, intravascular ultrasonography; LCP, lipid-core plaque; NIRS, near-infrared spectroscopy [290].

Un nouvel algorithme basé sur les propriétés spectrales du collagène est en cours de développement afin de détecter la présence d'une chape fibreuse amincie ou épaisse recouvrant la surface d'une plaque riche en lipides [283]. Plusieurs études prospectives sont présentement en cours afin de valider la capacité de NIRS-IVUS à identifier la présence de plaques vulnérables avant un SCA (PROSPECT II, NCT02171065; LCP, NCT02033694), de même que l'impact de stents biorésorbables sur l'amélioration de l'aire minimale de l'artère au suivi (PROSPECT-ABSORB, NCT02171065).

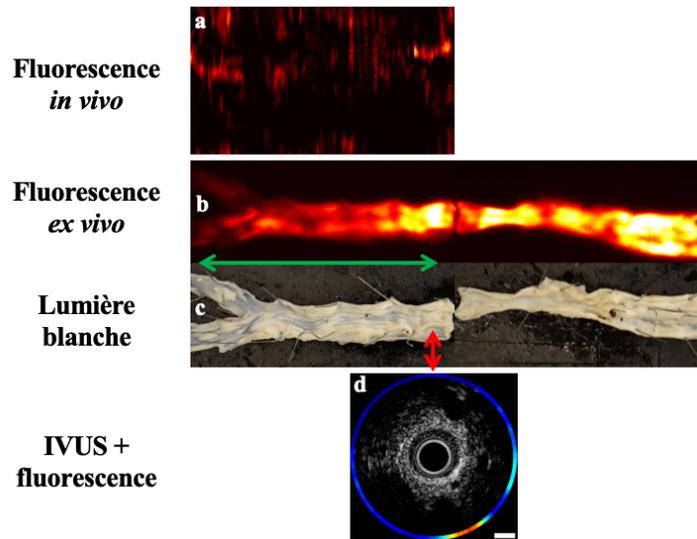
## 3.2. Technologies d'imagerie en émergence de la plaque d'athérosclérose

### 3.2.1. Modalités d'imagerie invasives

Plusieurs évidences provenant d'études histologiques démontrent que les modalités d'imagerie intravasculaire actuellement disponibles ont des limitations qui ne permettent d'évaluer adéquatement la morphologie et la biologie de la plaque d'athérosclérose, dont l'identification précise de la plaque vulnérable à haut risque de rupture.

#### 3.2.1.1. Fluorescence proche infrarouge (NIRF)

La fluorescence proche infrarouge (NIRF) est une modalité d'imagerie permettant de visualiser les mécanismes pathobiologiques de l'athérogenèse à l'échelle cellulaire *in vivo* (Figure 36). L'imagerie moléculaire par NIRF consiste à utiliser une source lumineuse incidente comme source de photons (600-950 nm) qui, lorsque transmise à des agents d'imagerie de contraste optique ou sonde fluorescente, émet de la fluorescence dans le spectre proche infrarouge qui est détectée par un filtre d'émission adapté et couplé à une caméra hautement sensible [291]. Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'ondes plus élevées permet d'augmenter la pénétration de la lumière dans les tissus dû à la réduction de l'absorption des photons par l'hémoglobine, les lipides, l'eau et par réduction de la détection d'autofluorescence [291]. Les avantages de la NIRF comme modalité d'imagerie moléculaire sont multiples, incluant une sensibilité de détection à l'échelle picomolaire, la polyvalence des ligands de ciblage (anticorps, peptides, phages, etc.) et la multitude de systèmes d'imagerie de détection de la fluorescence avec résolution micro- et macroscopique [292].



**Figure 36.** Comparaison d’images *in vivo* et *ex vivo* en fluorescence proche infrarouge (NIRF) d’une aorte abdominale dénudée suivant l’injection d’ICG chez un modèle de lapin athérosclérotique. (a) Imagerie acquise *in vivo* par cathéter NIRF-IVUS; (b) Image en fluorescence acquise *ex vivo* du segment correspondant, avec segment dénudé au ballon (flèche verte); (c) Image en lumière blanche de l’aorte abdominale et des artères iliaques; (d) Image en coupe transversale acquise par IVUS-NIRF correspondant au segment indiqué par la flèche rouge. Adaptée de [293].

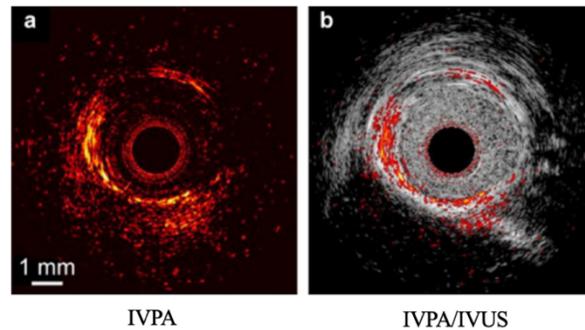
Depuis la dernière décennie, l’émergence des technologies d’imagerie invasives NIRF pour l’étude de la plaque d’athérosclérose coronarienne humaine a mené au développement de différents systèmes d’imagerie par cathéter, dont l’applicabilité de ces modalités d’imagerie invasives représente un réel potentiel de translation en clinique [293-303]. L’obtention d’un signal NIRF *in vivo* a été démontré dans des artères iliaques dénudées de lapins athérosclérotiques par l’injection systémique d’une protéase activable détectant l’activité enzymatique de la cystéine protéase [294-297], de même qu’avec le vert d’indocyanine (ICG) ciblant les plaques riches en lipides et en macrophages [293, 299, 300]. L’évaluation de l’activité inflammatoire au sein des plaques d’athérome fut également réalisée par imagerie NIRF-OCT couplée à l’injection systémique d’ICG dans les artères coronaires dénudées d’un modèle porcin diabétique et athérosclérotique [298]. Plusieurs agents d’imagerie NIRF ciblant des biomarqueurs de l’inflammation, le

calcium et l'angiogenèse sont en cours de développement [292]. Toutefois, le manque de traceurs d'imagerie moléculaire approuvés par le *Food and Drug Administration* (FDA) représente un obstacle majeur à la translation de cette technologie en pratique clinique [304]. De surcroît, cette technologie d'imagerie invasive par cathéter nécessitera au préalable de répondre aux exigences réglementaires pour l'utilisation sécuritaire chez l'humain, ce qui représente un autre écueil à l'application de cette technologie dans la pratique actuelle.

### 3.2.1.2. Photoacoustique

L'imagerie par photoacoustique intravasculaire (IVPA) est une modalité hybride d'imagerie optique – acoustique permettant d'évaluer la morphologie et la composition chimique de la paroi artérielle avec une bonne profondeur et résolution d'image [305]. Le principe de l'effet acoustique consiste en l'absorption de la lumière provenant d'un laser pulsatile (740-1400 nm) par les constituants de la paroi et la conversion d'énergie optique en chaleur, menant à une dilatation thermoélastique des tissus et en la création d'une onde acoustique dans la paroi. L'image générée constitue la représentation spatiale des ondes acoustique détectées par une sonde d'ultrasons et reflète l'état physiologique et pathologique des tissus sous-jacents (Figure 37) [306]. La différence de signature spectrale des composantes de la plaque permet de distinguer les différents types tissulaires [307]. De par les spectres d'absorption optique spécifiques des lipides, la photoacoustique intravasculaire est devenue une modalité d'imagerie d'intérêt pour détecter et caractériser le contenu lipidique des plaques d'athérosclérose d'artères coronaires humaines *ex vivo* [308, 309] et en *in vivo* dans un modèle animal [310]. D'autres biomarqueurs ont également été ciblés dont le calcium, les macrophages et les métalloprotéinases [308]. Toutefois, plusieurs limitations subsistent à l'utilisation de cette modalité d'imagerie en clinique, dont la vitesse d'acquisition des images des systèmes actuels, la miniaturisation des cathéters, la nécessité de bloquer l'écoulement de sang dans l'artère pour l'obtention d'un meilleur signal

photoacoustique et les coûts importants associés au développement de la technologie [311].



**Figure 37.** Imagerie *in vivo* du contenu en lipides dans l’aorte abdominale d’un lapin athérosclérotique par photoacoustique intravasculaire (IVPA) combinée à l’ultrasonographie (IVUS). (a) Image en coupe transversale de l’aorte abdominale par photoacoustique intravasculaire; (b) image en coupe transversale combinant IVPA/IVUS. Adaptée de [308].

### 3.2.1.3. Thermographie intravasculaire

La thermographie intravasculaire est une technique d’imagerie qui repose sur la technologie thermique infrarouge et qui détecte les variations de température à la surface de la paroi vasculaire. L’intérêt de mesurer la température vasculaire repose sur l’hypothèse que l’inflammation et la néovascularisation impliqués dans l’athérogenèse produisent des variations thermiques locales pouvant être mesurées à la surface de la plaque par utilisation d’un cathéter dédié [312, 313]. Puisque les plaques vulnérables sont associées à des processus inflammatoires complexes, les macrophages produisent de l’énergie thermique qui peut être détectée à la surface de plaques d’athérome [314]. De ce fait, des expériences menées sur des spécimens de carotides *ex vivo* ont démontré que la température mesurée en surface de la plaque était corrélée avec la densité des macrophages en présence et inversement avec l’épaisseur de plaque et la distance entre les régions abondantes en cellules inflammatoires et la lumière interne du vaisseau [314-316]. Cette technique a permis de démontrer que l’hétérogénéité thermique était supérieure chez les patients en

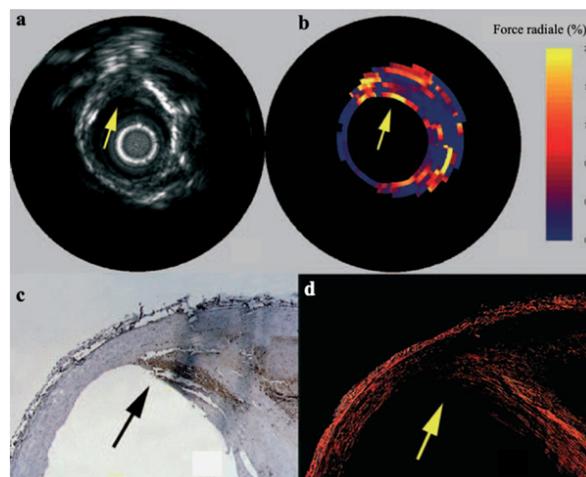
SCA par rapport à ceux avec angor stable et qu'il y avait une corrélation positive avec les caractéristiques morphologiques de la plaque vulnérable, telle que le remodelage positif [317-319]. Bien que les données préliminaires soient prometteuses, la thermographie intravasculaire comporte plusieurs limitations importantes. L'évaluation précise de la température nécessite un contact direct du cathéter avec la paroi du vaisseau, ce qui comporte un risque potentiel de dommage à l'endothélium [312]. De plus, le refroidissement engendré par le sang peut entraver l'interprétation des données par sous-estimation des mesures de variations thermiques [313, 320], ce qui pourrait nécessiter l'interruption du flot sanguin dans les technologies futures afin d'obtenir des résultats fiables [321, 322].

#### 3.2.1.4. **Élastographie intravasculaire : la palpographie**

L'élastographie intravasculaire et la palpographie sont des modalités d'imagerie qui évaluent les propriétés mécaniques locales de la paroi artérielle en mouvement [323]. La palpographie mesure les taux de déformations de la plaque (force radiale) en réponse à la pression intraluminaire. Le tissu examiné subit une déformation et la force radiale exercée sur la paroi avant et après déformation est déterminée par les signaux ultrasoniques enregistrés et représentée sous forme de cartographie de couleurs en complément de l'image acquise par IVUS, produisant un élastogramme de l'artère (Figure 38) [323-325]. La force radiale est directement liée aux propriétés mécaniques des constituants de la plaque : les tissus lipidiques et souples se déforment davantage que les tissus fibrocalcifiés et rigides [323]. Ainsi, plus la paroi est déformée, plus la force radiale est importante et plus le contenu en lipides est substantiel [323, 324]. La palpographie intravasculaire offre ainsi le potentiel de caractériser les différents types de plaques d'athérome.

Dans une étude de validation *ex vivo* de la technique d'imagerie effectuée sur des artères coronaires humaines explantées, la sensibilité et la spécificité de

détection des plaques vulnérables par palpographie étaient de 88% et 89%, respectivement [326]. De surcroît, la présence de TCFA ou d'infiltrats de macrophages étaient corrélés à des valeurs élevées de force radiale tissulaire [326]. Cette modalité d'imagerie a également été étudiée *in vivo*, dont chez un groupe de patients subissant une ICP [327], chez un modèle de porc miniature Yucatan [328] et chez des patients en SCA [329]. La palpographie a permis de détecter une incidence élevée de plaques déformables chez des patients en SCA et le nombre de lésions était corrélé à la présentation clinique, de même qu'aux niveaux de protéine C réactive (CRP) circulante [329]. Bien que les études suggèrent que la palpographie soit une modalité à considérer dans l'identification de plaques vulnérables, la principale limitation de cette technique sont les variations de la stabilité et la qualité du signal de la pression intracoronarienne en fonction du rythme et de la fréquence cardiaque [312].



**Figure 38.** Palpographie intravasculaire d'une artère coronaire humaine *in vivo*. (a) Coupe transverse de l'artère coronaire par IVUS; (b) élastogramme; (c) coupe histologique avec coloration des macrophages et ; (d) coloration du collagène. L'élastogramme révèle que la plaque a un rebord hautement déformable (flèche jaune), entourée de tissus non déformables. La coupe histologique correspondante révèle une région abondante en macrophages (flèche noire) arborant une chape fibreuse amincie (flèche jaune). Adaptée de [326].

### 3.2.1.5. Spectroscopie de Raman

Découverte en 1928, la spectroscopie de Raman est une modalité d'imagerie par microscopie optique permettant de caractériser la composition moléculaire et la structure externe d'un échantillon à son état naturel par diffusion inélastique d'un photon provenant d'une lumière monochromatique, soit *l'effet Raman* [330]. Ce principe physique survient lorsqu'une source lumineuse émise par un laser (532-785 nm) excite les liaisons moléculaires présentes au sein d'un échantillon de tissus donné, ce qui génère une diffusion polarisée d'une lumière à différentes longueurs d'ondes se traduisant par une quantification des composantes moléculaires en présence [330]. Chaque molécule est dotée d'une empreinte unique de pics d'intensité de diffusion Raman à des fréquences bien définies. Le spectre de Raman génère des informations provenant des liens chimiques des molécules, dont la fréquence vibrationnelle est exprimée en longueur d'onde ( $\lambda = \text{cm}^{-1}$ ) [331].

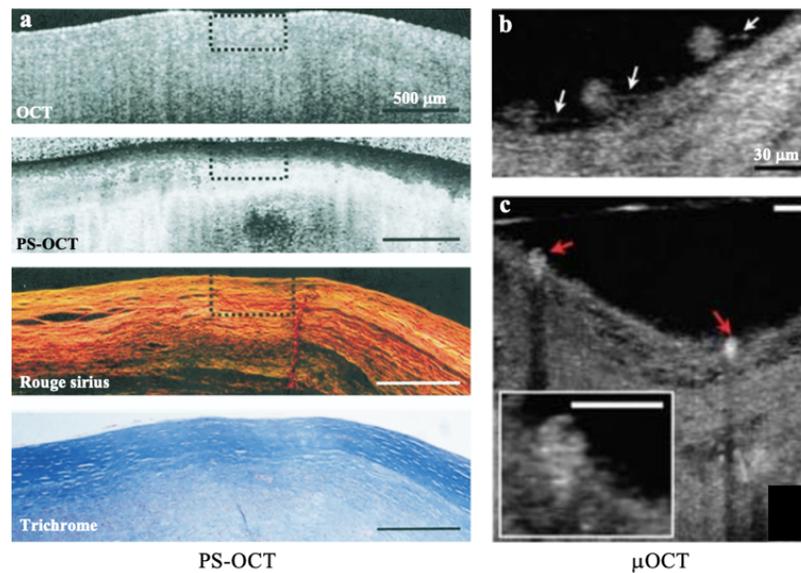
La composition biochimique par spectroscopie de Raman de divers tissus humains est décrite dans la littérature, dont les artères coronaires [332, 333], avec une bonne corrélation par comparaison à l'histologie et l'IVUS *in vitro* [334, 335]. Plusieurs études ont démontré la capacité de la spectroscopie de Raman à identifier les composantes de plaques d'athérosclérose *ex vivo* [336-338]. L'analyse chimique de segments d'artères coronaires humaines provenant de 9 cœurs explantés a permis de démontrer une bonne corrélation entre les spectres de Raman et l'analyse chimique standard de molécules de cholestérol, d'esters de cholestérol, de triglycérides, de phospholipides et de sels de calcium [332]. Ce même modèle d'analyse et quantification en Raman permettait de différencier les plaques d'athérome calcifiées de celles dénuées de calcium [339]. De plus, les effets d'une diète riche en cholestérol et d'un traitement hypolipémiant sur le développement de la plaque ont été démontrés dans une étude réalisée à partir d'un modèle murin transgénique apoE\*3-Leiden. L'analyse des spectres de Raman de l'aorte ascendante des animaux a démontré une corrélation entre l'accumulation de

cholestérol et les niveaux de cholestérol sériques, de même qu'une diminution de dépôts de calcium et de cholestérol dans la paroi artérielle des animaux traités par atorvastatine (Lipitor<sup>®</sup>, Pfizer, NY, E-U) [340, 341]. Le développement d'un cathéter permettant d'utiliser la spectroscopie de Raman dans diverses applications percutanées chez l'humain a été décrit, mais l'incapacité à générer un signal Raman ayant un bon rapport signal/bruit, la faible pénétrance tissulaire (1.0-1.5 mm), l'absorbance de la lumière par les constituants du sang et la miniaturisation des technologies sont, à ce jour, des limitations importantes dans le développement de cette modalité d'imagerie [342-344].

#### 3.2.1.6. **Micro-OCT et OCT polarisée (PS-OCT)**

Des variantes de la technologie d'OCT ont été développées dans les dernières années, dont l'OCT polarisé ou *polarized-sensitive OCT* ((PS)-OCT) et le micro-OCT [345]. Le PS-OCT mesure la biréfringence tissulaire, propriété physique d'un matériau qui est élevée dans des tissus contenant des protéines à structure ordonnée, telles que le collagène et l'actine-myosine (Figure 39) [346-348]. Le PS-OCT permet de quantifier le contenu et la densité en fibres de collagènes et en cellules musculaires lisses d'une plaque d'athérosclérose et de la chape fibreuse par mesure de la biréfringence tissulaire [348, 349]. Une étude réalisée dans des aortes athéromateuses a démontré une corrélation entre la présence abondante de fibres collagènes épaissies et/ou la présence de cellules musculaires lisses intima et une biréfringence tissulaire élevée [349]. D'autres études *ex vivo* ont démontré le potentiel de cette technologie pour évaluer le collagène de la plaque et pour distinguer l'intima normale des plaques fibreuses, fibrocalcifiées et lipidiques [348, 350]. Le développement d'un système d'imagerie par cathéter combinant PS-OCT a été développé, mais demeure à ce jour un outil utilisé pour des fins de recherche [351].

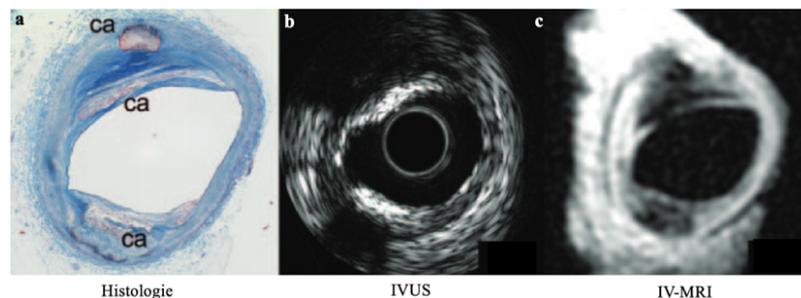
Le micro-OCT ( $\mu$ OCT) est une autre technologie permettant de visualiser la vascularisation de même que le contenu d'une plaque à l'échelle cellulaire. Cette technologie, de par sa résolution latérale de  $\leq 2 \mu\text{m}$ , permet de distinguer les différents leucocytes, de visualiser les cellules endothéliales, les cristaux de cholestérol et la diapédèse de cellules inflammatoires [352]. En somme, l'amélioration de la résolution permettrait d'imager la microstructure d'une artère coronaire humaine à une échelle comparable à l'histopathologie et pourrait optimiser l'identification et la caractérisation de plaques vulnérables (Figure 38). Le développement de cette modalité d'imagerie par cathéter pour l'utilisation *in vivo* est actuellement en émergence [353, 354].



**Figure 39.** Nouvelles technologies en OCT. (a) Image d'une plaque fibreuse d'artère coronaire humaine cadavérique par PS-OCT démontrant une biréfringence élevée dans la région riche en fibres de collagène (encadrés noires), avec coupe histologique correspondante en coloration Rouge sirius et Trichrome; (b)  $\mu$ OCT d'une artère coronaire humaine cadavérique démontrant de multiples leucocytes adhérents à la surface endothéliale via des structures linéaires, suggérant des pseudopodes (flèches blanches); (c) Transmigration de cellules avec morphologie similaire aux monocytes (flèche rouge) au travers l'endothélium. Adaptée de [349, 352].

### 3.2.1.7. L'imagerie par résonance magnétique intravasculaire

L'IRM évalue les propriétés biophysiques d'un tissu placé dans un champ magnétique externe statique et soumis à une impulsion de radiofréquence. Les photons émettent un signal détecté par une bobine dont l'intensité varie selon la composition des tissus et génère une image avec différents degrés de contraste (Figure 40) [355]. L'IRM intravasculaire (IV-MRI) consiste à intégrer les aimants et les bobines dans une sonde d'IRM qui est reliée à une console portable. Le développement de cathéters intravasculaires nécessaires à la détection du signal a permis d'optimiser le rapport signal/bruit, de même que la résolution spatiale de l'image (100  $\mu\text{m}$ ) [355]. La présente technologie permet en *ex vivo* de distinguer les différentes composantes de la plaque d'athérome, telles que la chape fibreuse, le pool lipidique et les calcifications [356]. Dans une étude préliminaire de faisabilité réalisée chez un modèle de lapins hypercholestérolémiques ayant subi une désendothélialisation de l'artère iliaque, le cathéter a permis de réaliser de l'imagerie *in vivo* de la paroi vasculaire sans obstruction préalable du vaisseau [357]. Les résultats cliniques démontrent la faisabilité et sécurité de la modalité pour la détection de plaques lipidiques dans les artères coronaires de patients avec lésions intermédiaires qui subissent une ICP [358]. Toutefois, le développement de IV-MRI demeure limitée de par son caractère invasif et sa faible disponibilité [60].



**Figure 40.** Comparaison d'une plaque calcifiée dans un spécimen d'artère coronaire humaine *ex vivo* par : (a) histologie; (b) imagerie par IVUS (b) et; (c) par IRM intravasculaire (IV-MRI). Les calcifications sont mieux discriminées par IV-MRI que par IVUS, avec corrélation par histologie conventionnelle. Abréviations : Ca, calcium; IV-MRI, intravascular magnetic resonance imaging; IVUS, intravascular ultrasonography. Adaptée de [355].

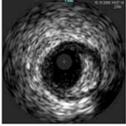
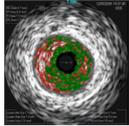
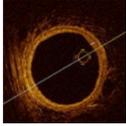
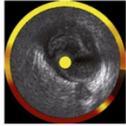
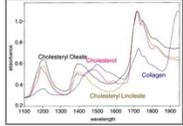
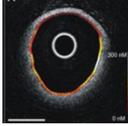
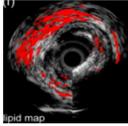
### 3.2.1.8. Modalités d'imagerie hybrides par cathéters combinés

La technique d'imagerie intravasculaire optimale pour des fins d'évaluation spécifique de l'intégralité de la paroi artérielle serait de combiner l'imagerie par spectroscopie afin de caractériser la composition tissulaire, tout en ayant la résolution de l'OCT et la pénétrance tissulaire de l'IVUS [356, 359]. Plusieurs approches hybrides sont proposées afin de surmonter les limitations propres à chaque modalité d'imagerie (Tableau IX), dont l'IVUS-OCT [360], OCT-NIRS [361], IVUS-photoacoustique-NIRF [302], NIRF-OCT/IVUS [362] et NIRAF-OCT [303]. L'approche multimodale en imagerie intracoronarienne *in vivo* semble offrir une évaluation synergique de la composition et de la biologie de la plaque d'athérome qui permettrait de mieux définir la plaque vulnérable.

### 3.2.2. Modalités d'imagerie non invasives combinées : TEP-TDM et TEP-IRM

Depuis les dernières années, la communauté médicale a observé un essor dans le développement de technologies hybrides combinant les modalités d'imagerie conventionnelles (TDM et l'IRM) à la TEP afin de détecter, quantifier et caractériser l'athérosclérose coronarienne [62, 63]. La combinaison de ces technologies permet d'évaluer l'activité inflammatoire et processus biologiques au sein d'une plaque d'athérosclérose par quantification d'un radiopharmaceutique (traceur), tout en ayant une coregistration simultanée de la structure anatomique de la plaque et de l'étendue de la maladie coronarienne [364]. L'utilisation de <sup>18</sup>FDG-TEP en combinaison à l'IRM permet d'améliorer la caractérisation de l'activité des macrophages au sein de la plaque d'athérome [63]. De plus, il fut démontré qu'une absorption élevée de FDG dans les carotides de patients asymptomatiques était un facteur prédictif indépendant d'événements cardiovasculaires [365]. Ainsi, la possibilité d'identifier des plaques d'athéromes coronariennes à haut risque de rupture par modalités d'imagerie intégrant

TEP-TDM et TEP-IRM a suscité un réel intérêt en imagerie moléculaire et serait une avenue pour raffiner l'évaluation et la stratification des patients avec MCAS [60].

							
	IVUS	VH-IVUS	OCT	NIRS	Spectroscopie de Raman	NIRF	Photoacoustique
Caractéristiques	Ultrasons		Lumière proche infrarouge	Lumière proche infrarouge	Lumière proche infrarouge	Imagerie optique + lumière	Lumière proche infrarouge + ultrasons
Source d'énergie	Nuances de gris	Couleurs					
Cibles d'imagerie	Paroi artérielle et lumière	Fibrose, centre nécrotique, calcium, fibro-lipidique	Paroi artérielle et lumière	Composition chimique des tissus	Composition chimique des tissus	Sondes moléculaires	Paroi artérielle et lumière
Résolution spatiale (µm)	100-150	100	10	1000	-	1000	< 50
Profondeur (mm)	10	10	2-3	-	1-1.5	10-20	5
Limitations	Résolution spatiale et temporelle		Profondeur Vidange de sang	Profondeur dû à l'absorption par le sang	Profondeur dû à l'absorption par le sang	Profondeur dû à l'absorption par le sang	Profondeur dû à l'absorption par le sang
Composition de la plaque		✓	✓		✓		✓
Remodelage	✓	✓					
Fardeau lipidique	✓	✓					
Chape fibreuse		✓	✓				
Macrophages			✓			✓	
Néoangiogenèse			✓				
Pool lipidique		✓	✓	✓	✓		✓
Imagerie moléculaire						✓	

**Tableau IX.** Comparaison des différentes modalités d'imagerie intravasculaire par cathéter pour la détection et caractérisation de la plaque d'athérosclérose. IVUS, intravascular ultrasound; NIRF, near-infrared fluorescence; NIRS, near-infrared spectroscopy; OCT, optical coherence tomography; VH-IVUS, virtual histology. Adapté de [9, 60, 72, 261, 262, 272, 278, 279, 281, 291, 305, 330, 363].

## 4. L'imagerie moléculaire en athérosclérose

L'imagerie moléculaire a pour but d'évaluer les biomarqueurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérogenèse. En combinant diverses modalités d'imagerie permettant de visualiser l'anatomie et la physiologie à l'échelle macroscopique, l'imagerie moléculaire en athérosclérose permet de détecter les processus immunobiologiques au sein de la plaque d'athérome (visée diagnostic), de raffiner la capacité à prédire la survenue de complications vasculaires (visée pronostic) et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques futures (visée thérapeutique) [366].

### 4.1. Les agents d'imagerie

L'imagerie moléculaire repose sur l'utilisation d'agents de contraste qui vont cibler des processus biologiques ou cellules spécifiques impliqués dans l'athérogenèse. Plusieurs sondes d'imagerie ont été développées afin d'évaluer avec précision certains biomarqueurs de la plaque d'athérome, et ce à tous les stades de développement de l'athérogenèse [176, 366-371]. Afin d'obtenir une imagerie de qualité à l'échelle cellulaire, les agents de contraste doivent avoir une longue demi-vie en circulation, une affinité et spécificité élevées pour l'épitope d'intérêt, être minimalement toxiques, avoir un ratio signal/bruit élevé afin d'obtenir des images nettes, être simples à utiliser en clinique et compatibles avec les systèmes d'imagerie standards commercialisés [367]. Une sonde d'imagerie moléculaire peut être : (1) couplée à un ligand (anticorps ou fragments d'anticorps, petits peptides, polysaccharides, phages, etc.) ayant une haute affinité pour la molécule cible; (2) modifiable afin d'être facilement absorbée par des cellules spécifiques et; (3) activable par la cible enzymatique visée (i.e. pro-drogue) [366]. Les composés de détection du signal incluent les molécules iodées pour l'imagerie par TDM, les microbulles pour l'imagerie par ultrasons, les radio-isotopes pour l'imagerie en médecine nucléaire (TEP et TEMP), les composés paramagnétiques (gadolinium) et superparamagnétiques (oxyde de fer) pour l'imagerie par IRM et les fluorophores pour l'imagerie optique (NIRF) [366, 367, 371-375].

## 4.2. Plateformes d'imagerie

Le choix de la plateforme d'imagerie à utiliser en imagerie moléculaire dépend de plusieurs facteurs. D'abord, la modalité d'imagerie doit être hautement sensible afin de détecter des biomarqueurs d'intérêts localisés dans des organes profonds et fréquemment présents en très faible concentration [366]. De plus, elle doit avoir une haute résolution spatiale et temporelle afin de détecter le signal et d'évaluer la pharmacocinétique d'un traceur. Plusieurs modalités non invasives sont actuellement disponibles pour l'imagerie moléculaire en athérosclérose, soient en tant que technologies autonomes ou combinées (TEP/TEMP-IRM, TEP/TEMP-TDM) (Tableau X) [366, 370]. L'imagerie optique (NIRF), de même que la tomographie moléculaire en fluorescence (FMT) seule ou intégrée à la TDM, IRM ou aux ultrasons, sont parmi les technologies en émergence [370].

## 4.3. Cibles moléculaires de la plaque d'athérome inflammatoire

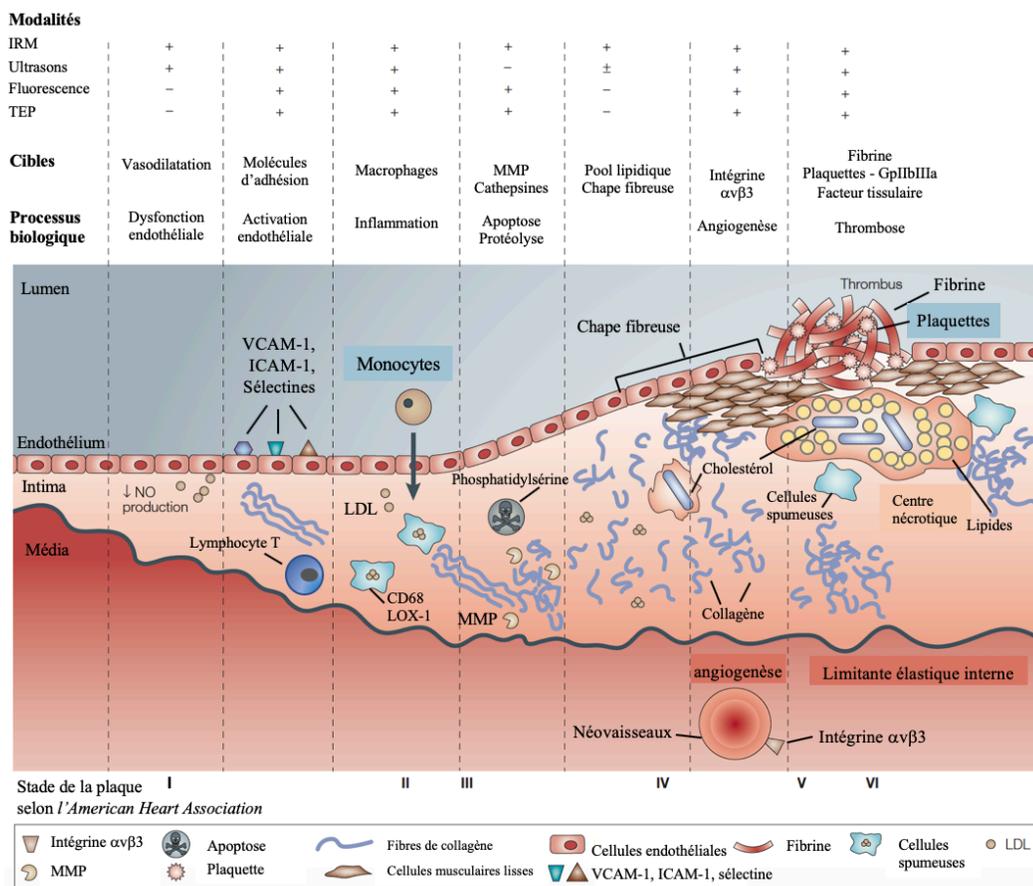
### 4.3.1. Activation de l'endothélium et adhésion cellulaire

L'imagerie moléculaire durant la phase initiale de l'athérogenèse cible les molécules d'adhésion cellulaires surexprimées à la surface des cellules endothéliales (Figure 41). VCAM-1 module l'adhésion sélective des monocytes et lymphocytes T à l'endothélium vasculaire via l'intégrine VLA-4. Parmi les agents utilisés pour l'imagerie de VCAM-1, des fragments d'anticorps (*nanobodies*) couplés au traceur  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -cAbVCAM1-5) [376, 377], de même que des peptides ciblant VLA-4 [378-380], ont été développés afin de détecter les plaques d'athérosclérose. Ces traceurs peuvent également être couplés à d'autres radio-isotopes, particules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIO), fluorophores ou microbulles pour des fins d'imagerie par IRM, TEP, FMT ou ultrasons [376]. Le peptide B2702p1 dérivé du complexe d'histocompatibilité 1 (CMH-1), récepteur exprimé à la surface des leucocytes, a démontré une grande affinité de liaison et spécificité pour la détection de plaques d'athérome dans un modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup> (peptide B2702p1 marqué au  $^{99m}\text{Tc}$ ) [381].

Modalités d'imagerie moléculaires	Résolution spatiale (µm)	Profondeur (mm)	Temps d'acquisition	Composés d'imagerie	Cibles moléculaires	Applications cliniques	Avantages	Désavantages
<b>Optique</b>								
<b>NIRF</b>	1000	1-20	min	Fluorophores	CAM, monocyte, macrophage, collagène, protéases, Ca <sup>2+</sup> , thrombus	-	haute résolution	interfère avec l'hémoglobine, Invasif, expérimental
<b>Tomographie en fluorescence</b>	1000	1-10	min	Fluorophores		-		expérimental
<b>Ultrasons</b>	50	1-200	s-min	microbulles	CAM, intégrines, glycoprotéines	morphologie de la plaque, épaisseur intima-media, vélocités du flot	pas de radiation Résolution temporelle et spatiale élevées Temps réel	opérateur dépendant, limitation par structures adjacentes (os)
<b>TDM</b>	50	> 300	s-min	molécules iodées	Calcifications	morphologie de la plaque, sténoses coronaires	Résolution spatiale et temporelle élevées	radiations, faible sensibilité
<b>Nucléaire</b>								
<b>TEP</b>	2000	> 300	min-h	<sup>18</sup> F, <sup>64</sup> Cu, <sup>11</sup> C	FDG, CAM, intégrines, fibrine, Ca <sup>2+</sup>	inflammation de la plaque	Très sensible, quantitatif	radiation, radioactivité, faible résolution spatiale
<b>TEMP</b>	2000	> 300	min-h	<sup>99m</sup> Tc, <sup>123/124/125/131</sup> I, <sup>111</sup> In	CAM, lipoprotéines, macrophages, protéases, glycoprotéines, apoptose	perfusion myocardique		
<b>IRM</b>	10-100	> 300	min-h	gadolinium, nanoparticules superparamagnétiques	CAM, macrophages, MMP, lipoprotéines, apoptose, nécrose, intégrines, fibrines, Ca <sup>2+</sup>	quantification des sténoses, morphologie de la plaque, flot coronarien	Pas de radiation, très sensible, résolution spatiale et temporelle élevées	coûteux, peu disponible, C-I dispositifs métalliques

**Tableau X.** Modalités d'imagerie moléculaire non invasives de l'athérosclérose. <sup>11</sup>C, carbone-11; Ca<sup>2+</sup>, calcium; CAM, cellular adhesion molecule; C-I, contre-indication; <sup>64</sup>Cu, cuivre-64; <sup>18</sup>F, fluor-18; FDG, fluorodésoxyglucose; h, heures; <sup>123/124/125/131</sup>I, iode-123/124/125/131 ; <sup>111</sup>In, indium-111 ; IRM, imagerie par résonance magnétique; min, minutes; MMP : métalloprotéinases; NIRF, near-infrared fluorescence; s, secondes; <sup>99m</sup>Tc, technetium-99m; TEMP, tomographie par émission monophotonique; TEP : tomodensitométrie par émission de positrons. Adapté de [372, 373, 375].

Des microbulles ciblant ICAM-1 peuvent également lier spécifiquement et activer les cellules endothéliales *in vitro* et au sein de lésions athéromateuses d'artères carotides *in vivo* [382, 383]. La présence de captation de l'anticorps monoclonal  $^{64}\text{Cu}$ -anti-P-selectin dans l'aorte de souris LDLR<sup>-/-</sup> alimentées sous diète riche en cholestérol pendant 12 semaines était nettement supérieure au signal obtenu chez les souris alimentées sous diète régulière, démontrant une accumulation spécifique du traceur dans l'arche aortique athéromateux de ce modèle animal [384]. La combinaison de traceurs ciblant VCAM-1, E-sélectine ou P-sélectine, a démontré une spécificité de liaison *in vivo* >5-fois pour l'endothélium par comparaison à un seul traceur détecté par IRM [385].



**Figure 41.** Cibles moléculaires d'imagerie de la plaque d'athérosclérose. Les symboles (+ ou -) indiquent la faisabilité de la modalité d'imagerie selon la/les cibles moléculaires au sein de la plaque. ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule 1; IRM, imagerie par résonance magnétique, LDL, low-density lipoprotein; LOX-1, lectin-type oxidized LDL receptor 1; MMP, métalloprotéinases; TEP, tomodensitométrie par émission de positrons; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule. Adapté de [176, 369, 370].

### 4.3.2. Activation des macrophages et cellules spumeuses

Le signal  $^{18}\text{F}$ -FDG détecté par la TEP au sein de plaques athéromateuses est corrélé à l'augmentation de l'activité métabolique des macrophages, reflétant un processus inflammatoire actif dans les stades précoces de l'athérogenèse [63, 386, 387]. Des études précliniques effectuées chez un modèle de lapins athérosclérotiques ont démontré une forte corrélation entre la captation cellulaire augmentée du  $^{18}\text{F}$ -FDG et la densité des macrophages en présence dans la plaque [388, 389]. Une étude prospective effectuée auprès de 8 patients avec sténose carotidienne symptomatique a démontré la présence d'un signal nettement plus fort du  $^{18}\text{F}$ -FDG dans l'artère carotide rétrécie par la plaque, par comparaison au vaisseau controlatéral (contrôle) [390], de même qu'une forte corrélation entre le signal  $^{18}\text{F}$ -FDG visualisé et la densité des macrophages mesurée par immunohistochimie – CD68 *ex vivo* dans les spécimens post-endartérectomie [391]. En plus des artères carotides, le PET  $^{18}\text{F}$ -FDG a été utilisé afin d'évaluer l'inflammation dans l'aorte, les artères coronaires et les artères périphériques athéromateuses [392]. Plusieurs études ont démontré que le niveau de captation vasculaire du  $^{18}\text{F}$ -FDG est également fortement corrélé à la présence de facteurs de risque cardiovasculaires, au score de risque cardiovasculaire de Framingham, à l'âge avancé [393], à la présence de biomarqueurs d'inflammation (protéine C réactive et métalloprotéinases) [394-396] et à l'expression de marqueurs impliqués dans la glycolyse et processus inflammatoires, dont le transporteur de glucose 1 (GLUT1), l'hexokinase, CD68, MMP-9 et l'interleukine-18 (IL-18) [387, 395]. Un signal  $^{18}\text{F}$ -FDG est rarement observé dans les zones calcifiées d'une artère, supportant le concept que l'inflammation et l'apparition de calcifications surviennent à des stades différents de l'athérogenèse [392].

En plus du FDG, plusieurs autres marqueurs sont utilisés pour cibler les macrophages activés en phase précoce d'athérosclérose, dont les chimiokines, les récepteurs exprimés à la surface membranaire, la protéine de translocation (TSPO) et la choline [63, 366, 375].

#### 4.3.2.1. **Chimiokines**

Les chimiokines et leurs récepteurs sont également des biomarqueurs potentiels pour l'évaluation de la progression de la plaque. Dans un modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup> avec accélération du développement d'athérosclérose par dénudation des artères fémorales, la captation du peptide liant le CCR5 D-Ala<sub>1</sub>-peptide T-amide (DAPTA) marqué au <sup>64</sup>Cu était augmentée au site de la plaque [397, 398]. Le MCP-1 et son récepteur CCR2 sont impliqués dans la transmigration des leucocytes vers l'intima par création d'un gradient chimiotactique puissant. Dans un modèle de lapin athérosclérotique soumis à une diète riche en cholestérol suivant une dénudation par ballon des artères iliaques et abdominales, le traceur MCP-1 marqué à l'iode-125 s'accumulait de façon sélective dans les régions riches en lipides et en macrophages et la captation du traceur était corrélée à la sévérité de la lésion [399]. De plus, la captation de <sup>125</sup>I-MCP-1 était corrélée aux analyses en immunohistochimie avec RAM-11 (anticorps monoclonaux spécifiques aux macrophages des lapins) sur coupes histologiques des artères *ex vivo*.

#### 4.3.2.2. **Récepteurs de l'interleukine-2**

Les lymphocytes T activés au sein de la plaque d'athérosclérose expriment à leur surface des récepteurs IL-2 pouvant lier l'interleukine-2 (IL-2), cytokine dont le rôle est d'activer la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires et promouvoir l'inflammation [400]. Dans une étude ayant recruté 14 patients éligibles pour une endartérectomie carotidienne, l'imagerie par TEMP avec injection de <sup>99m</sup>Tc-IL2R a démontré une captation augmentée du traceur dans les plaques d'athérome avec corrélation du nombre de cellules exprimant le récepteur IL-2 (IL-2R) par cytométrie de flux [401]. Le <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-IL-2 est un autre traceur ayant démontré une captation sélective au niveau lymphocytes T présents dans la plaque vulnérable d'artères carotides [402].

#### 4.3.2.3. Récepteur des molécules LDL oxydés 1

Le récepteur des molécules LDL oxydés 1 (LOX-1) est exprimé à la surface de cellules endothéliales et macrophages activés dans les phases précoces du développement de l'athérosclérose. L'imagerie par TEP suivant l'injection d'un anticorps monoclonal LOX-1 couplé au  $^{99m}\text{Tc}$  dans un modèle de lapin avec hypercholestérolémie familiale (Watanabe) a permis de démontrer une accumulation plus marquée et spécifique du traceur dans l'aorte abdominale des animaux, par comparaison aux lapins contrôles [403]. CD68, protéine exprimée à la surface des monocytes et macrophages, peut favoriser la formation de cellules spumeuses par liaison et internalisation des molécules de LDL oxydés. L'administration d'un traceur  $^{124}\text{I}$ -CD68-Fc dans un modèle murin ApoE<sup>-/-</sup> a démontré une bonne corrélation entre l'intensité du signal et l'étendue de la lésion *ex vivo* 48 heures post-injection [404].

#### 4.3.2.4. Récepteur 2 de la somatostatine

Certains récepteurs de la somatostatine sont exprimés à la surface des macrophages activés et des cellules endothéliales endommagées, ayant un rôle dans la modulation de l'inflammation et de l'angiogenèse [405].  $^{68}\text{Ga}$ -DONATE est un traceur utilisé en imagerie TEP qui se lie spécifiquement au récepteur 2 de la somatostatine (SSTR2), dont l'expression à la surface des macrophages est induite *in vitro* par le lipopolysaccharide, molécule induisant une réponse inflammatoire [406]. La captation du  $^{68}\text{Ga}$ -DONATE dans les artères coronaires a été démontrée dans une étude rétrospective de 70 patients atteints de cancer, dont la captation dans l'artère coronaire IVA était corrélée de façon significative avec la présence de plaques calcifiées et d'événements cardiovasculaires antérieurs [407]. D'autres études ont également démontré une corrélation entre la captation de  $^{68}\text{Ga}$ -DONATE dans l'aorte, les carotides et artères iliaques et la présence de plaques calcifiées, sans toutefois percevoir de colocalisation entre la captation des traceurs  $^{68}\text{Ga}$ -DONATE et  $^{18}\text{F}$ -FDG, suggérant une spécificité divergente de ceux-ci pour l'inflammation [408].

#### 4.3.2.5. Protéine de translocation

Le  $^{11}\text{C}$ -PK11195 est un traceur liant la protéine de translocation (TSPO) localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie [63]. L'activation du TSPO dans les macrophages activés a été identifiée dans des spécimens *ex vivo* d'endartérectomie carotidienne, avec colocalisation du signal par immunohistochimie – CD68 [409], de même qu'au niveau de sténoses carotidiennes chez 32 patients symptomatiques [410]. Toutefois, le  $^{11}\text{C}$ -PK11195 a une faible intensité de signal vasculaire et se lie de façon non spécifique à différents types cellulaires, limitant ainsi son utilisation dans les études cliniques futures en athérosclérose [63].

#### 4.3.3. Cellules spumeuses, LDL et stress oxydatif

Au sein de la région sous-endothéliale, les monocytes vont se différencier en macrophages sous la régulation du MCSF et exprimer en surface divers récepteurs éboueurs, dont le SRA et le CD36, permettant d'internaliser et de dégrader les molécules LDL modifiées par oxydo-réduction [139, 411]. L'accumulation de LDL dans la plaque d'athérosclérose contribue à la formation, progression et déstabilisation des lésions. Des études précliniques ont démontré une captation augmentée de particules LDL marquées à un radio-isotope, incluant  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  et  $^{111}\text{Tc}$ , chez des lapins athérosclérotiques [412]. Des études cliniques subséquentes ont démontré l'obtention d'une captation augmentée de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -LDL dans les artères carotides, artères coronaires, iliaques et fémorales de 7 patients avec plaques d'athérome. L'analyse *ex vivo* de spécimens d'endartérectomie chez 6 des 7 patients a révélé un signal de 2 à 4 fois plus élevé dans les lésions riches en macrophages [412, 413].

Puisque les macrophages vont internaliser davantage des particules LDL-oxydés via leur récepteur éboueur, des particules de LDL-oxydés ont été marquées au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  et imagés au niveau de plaques d'artères carotides humaines symptomatiques. L'imagerie par TEMP a démontré une captation plus élevée de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -oxLDL au sein de carotides

avec présence de lésions par comparaison aux carotides saines [414]. Aucune corrélation n'a toutefois été établie entre le degré d'intensité du signal et la sévérité de la sténose. Des anticorps marqués par un radio-isotope se liant à des épitopes spécifiques des particules LDL ont été étudiés. Les anticorps MDA2 (*malondialdéhyde-2*) sont les plus utilisés en recherche, prototype d'anticorps monoclonal murin qui se lie à l'épitope malondialdéhyde à la surface de molécules LDL-oxydés s'exprimant lors d'un stress oxydatif [415]. Des études précliniques réalisées chez des souris ApoE<sup>-/-</sup> et des lapins Watanabe avec dyslipidémie familiale ont démontré que les lésions riches en lipides accumulent jusqu'à 20 fois plus de <sup>125</sup>I-MDA2 que les tissus artériels normaux, avec colocalisation de la captation du <sup>125</sup>I-MDA2 par les cellules spumeuses démontrée par immunohistochimie [416].

#### 4.3.4. L'activité des protéases

Les métalloprotéinases (MMP) et la cystéine protéase contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire et à l'affaiblissement de la chape fibreuse, donc à l'instabilité de la plaque. Plusieurs traceurs inhibant l'activité des MMP ont été couplés à différents radio-isotopes tels que <sup>123</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc ou <sup>18</sup>F pour des fins d'imagerie par TEP et TEMP. Schäfers et collègues ont démontré une captation augmentée du traceur inhibiteur <sup>123</sup>I-HO-CGS 27023A dans les artères carotides lésées d'un modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup> sous diète enrichie en cholestérol, par comparaison à un contrôle [417]. Le seul traceur actuellement disponible pour l'imagerie par IRM est le P974, un peptide couplé au Gd-chélaté, qui se lie sélectivement aux MMP [61].

L'imagerie moléculaire utilisant des agents fluorescents en proche infrarouge a été adaptée pour évaluer l'activité enzymatique de la cystéine protéase. Une sonde d'imagerie inactive fut synthétisée afin d'émettre un signal fluorescent lorsque clivée par la cystéine protéase au sein de la plaque d'athérome [366]. Le signal émis est quantifié et représente l'activité enzymatique au sein de la plaque d'athérome. Une étude fut préalablement réalisée par imagerie intravasculaire NIRF *in vivo* dans des artères

iliaques dénudées de lapins athérosclérotiques, suivant l'injection d'un agent activable (Prosense750) et démontra l'obtention d'un signal de forte intensité dans la plaque d'athérome [295, 296, 418].

#### **4.3.5. Matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire est une composante importante de la plaque d'athérosclérose à des phases avancées de l'athérogenèse. Les fibres de collagènes et les protéoglycanes sont distribués de façon non uniforme dans la plaque et assurent la stabilité de celle-ci, de même que l'intégrité de la chape fibreuse. Le Gadofluorine M, complexe hydrosoluble dérivé du Gd-chélaté, est un traceur d'imagerie se liant spécifiquement aux composantes de la matrice extracellulaire de plaques d'athérome [63]. Barkhausen et collègues ont démontré que le Gadofluorine M rehausse la paroi de l'aorte visualisée par TEP chez des lapins Watanabe avec hypercholestérolémie familiale, phénomène qui ne fut pas observé chez les lapins sains (contrôle) [419].

#### **4.3.6. L'apoptose**

La phagocytose excessive des cellules inflammatoires par les macrophages mène à la dérégulation du processus d'apoptose et à la prolifération de la plaque [194-196]. Durant l'apoptose, les enzymes flippases s'activent et redistribuent les phosphatidylsérines de la couche interne vers la couche externe de la membrane cellulaire. L'annexine A5 se lie avec une forte affinité à la phosphatidylsérine (PS) et détecte précocement l'apoptose [375]. En imagerie par TEMP, le  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin-V a démontré une captation augmentée dans les artères coronaires de porcs athérosclérotiques [420], de même que dans des modèles murins et lapins athérosclérotiques, avec une bonne corrélation entre la spécificité de liaison de l'annexine-V et les marqueurs histologiques de l'apoptose [421, 422]. Le  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin-V a subséquemment été utilisé dans l'évaluation de plaques carotidiennes chez 4 patients, dont 2 ayant eu un événement ischémique cérébrale transitoire (ICT) dans les

semaines précédentes [423]. Une captation du traceur a été observée dans la région cervicale des 2 patients avec antécédents récents d'ICT, alors qu'il y avait absence de signal chez les autres patients. De plus, l'analyse du signal *ex vivo* après endartérectomie a démontré une corrélation entre le signal  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin-V obtenu et le contenu en macrophages de la plaque. Ces résultats suggèrent que le  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin-V pourrait être un traceur potentiel pour l'imagerie en scintigraphie de la plaque, bien que d'autres études soient nécessaires afin de démontrer une corrélation anatomique du signal par TEMP.

#### 4.3.7. Angiogenèse

La prolifération de la vasa vasorum de l'adventice vers l'intima peut mener à des hémorragies intraplaques qui permettront d'identifier les plaques à haut risque de rupture. L'intégrine  $\alpha v\beta 3$ , le récepteur de la fibronectine et de la vitronectine, est exprimée à la surface de l'endothélium et des macrophages activés et stimule l'angiogenèse par interaction avec des récepteurs de facteurs de croissance [63]. Le tripeptide RDG (Arg-Gly-Asp), ayant une haute affinité pour l'intégrine  $\alpha v\beta 3$ , a été couplé à différents isotopes radioactifs pour l'imagerie en athérosclérose [63]. Le  $^{99m}\text{Tc}$ -NC100692 a démontré une grande affinité pour la plaque d'athérosclérose carotidienne dans un modèle de lapins athérosclérotiques par imagerie TEMP. En TEP, l'utilisation du  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGD a démontré un signal dans un modèle murin athérosclérotiques ApoE<sup>-/-</sup>, ainsi que chez 4 humains avec plaques d'athérome au sein des carotides [424]. Le  $^{18}\text{F}$ -Galacto-RGD est un autre traceur ayant démontré une captation augmentée chez 10 patients avec plaques d'athérome carotidiennes [425]. Une des limitations potentielles de l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  comme cible moléculaire est l'imagerie simultanée des macrophages et des néovaisseaux au sein de la plaque vulnérable, la rendant ainsi moins spécifique pour un biomarqueur donné. Le récepteur VEGF exprimé à la surface de l'endothélium a également été utilisé comme cible d'imagerie par utilisation d'un anticorps monoclonal marqué au zirconium-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ) en imagerie TEP [426].

#### 4.3.8. Microcalcifications

Les calcifications sont présentes à tous les stades de l'athérogenèse, mais fréquemment observées dans les lésions athérosclérotiques progressives et avec l'âge avancé. Les microcalcifications denses peuvent être ciblées comme marqueur d'athérosclérose accéléré avec risque de rupture de la plaque [139]. Dans une étude clinique prospective ayant utilisé le  $^{18}\text{F}$ -sodium fluoride (NaF) dans la détection par TEP des microcalcifications d'artères coronaires de patients en SCA ou angine stable, la captation augmentée du signal dans les plaques était associée à des événements cardiovasculaires adverses. Le signal détecté au  $^{18}\text{F}$ -NaF était localisé au sein de lésions arborant d'autres marqueurs de vulnérabilité de la plaque [427].

#### 4.3.9. Thrombose

La rupture de la chape fibreuse permet aux éléments sanguins circulants d'entrer en contact direct avec les composantes hautement thrombogéniques du centre nécrotique, résultant en une cascade d'événements menant à la formation d'un thrombus endoluminal [139]. Plusieurs médiateurs impliqués dans l'hémostase et la coagulation peuvent servir de cibles d'imagerie moléculaire afin de détecter la survenue de thrombose et d'hémorragie intraplaque [375]. Un peptide liant la fibrine, EP-2104R, couplé au  $^{64}\text{Cu}$ , a permis de détecter les dépôts de fibrine au sein de thrombus artériels chez des rats par TEP [428]. Ce même peptide, conjugué au Gd pour détection par IRM, fut administré chez 52 sujets avec suspicion d'événements thrombotiques et démontra une sélectivité plus importante pour les thrombus artériels (84%) par rapport aux thrombus veineux (29%) [429]. La glycoprotéine GpIIb/IIIa, localisée à la surface des plaquettes et impliquée dans l'agrégation plaquettaire par liaison du fibrinogène, est également un biomarqueur d'intérêt dans l'évaluation des phénomènes thrombotiques. L'imagerie par TEMP  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -apcitide, un agoniste peptidique compétitif du fibrinogène pour le récepteur IIb/IIIa, a démontré une sensibilité (92%) et spécificité (90%) élevées pour les thromboses veineuses profondes primaires et récurrentes dans une étude clinique menée chez 78 patients [430].

## 5. Validation de l'histologie 3D *ex vivo*

L'histologie conventionnelle est largement utilisée pour évaluer les propriétés microstructurales des tissus biologiques à l'échelle cellulaire et pour validation de mesures acquises par diverses modalités d'imagerie telle que l'IRM [431]. Toutefois, l'histologie ne représente qu'un nombre limité de coupes transversales d'un tissu et ne permet pas d'évaluer l'architecture complète d'un l'organe entier. Malgré les avancées de la dernière décennie dans les technologies d'imagerie invasives par cathéter, l'histologie demeure l'étalon-or pour évaluer la composition et la géométrie de la plaque d'athérosclérose. La tomographie en cohérence optique (OCT) à haute résolution est une technologie en émergence dans le domaine de l'imagerie des organes et des tissus cardiaques [432-434]. L'imagerie par OCT utilise une source lumineuse dans l'infrarouge proche et capture les images tridimensionnelles (3D) d'un tissu, avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre. De plus, elle ne requiert aucun agent de contraste exogène. Toutefois, l'absorption de la lumière par les tissus imagés est limitée en proche infrarouge, avec une pénétrance des tissus atteignant environ 1 mm.

### 5.1. Principe

L'histologie 3D basée sur l'OCT en face combinée au tranchage sérié de tissus a été démontrée comme une technique permettant de reconstruire et visualiser un organe ou tissus entiers [435, 436]. De précédentes études ont démontré l'utilisation de l'imagerie par OCT sériée pour caractériser les fibres myélinisées du cerveau, de même que le myocarde [435, 436]. Afin de mieux caractériser les processus biologiques impliqués dans l'athérosclérose, une nouvelle plateforme d'histologie 3D automatisée *ex vivo* fut développée et validée par le laboratoire du Dr Frédéric Lesage de l'École Polytechnique de Montréal, dont la technologie constitue un système d'imagerie bimodal combinant l'OCT couplé à la microscopie confocale en fluorescence [436]. Il a été démontré que la microscopie confocale en fluorescence permet d'identifier précisément les mêmes biomarqueurs qu'en imagerie par NIRF [437]. En couplant cette modalité d'imagerie à l'OCT dans un contexte *ex vivo*, il

est possible de colocaliser un signal fluorescent détecté par imagerie *in vivo*, offrant ainsi un outil de validation pour l'imagerie moléculaire de l'activité inflammatoire de la plaque d'athérosclérose *in vivo* [437].

## 5.2. Le système d'imagerie

Le système d'imagerie consiste en un scanner OCT permettant de trancher séquentiellement, à l'aide d'un vibratome et de moteurs ayant une précision micrométrique, des sections d'une artère enrobée dans l'agarose. Chaque tranche de tissu (200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) est scannée séquentiellement afin d'imager chaque sous-région d'une large surface, créant une image en mosaïque à l'échelle microscopique. Pour des fins de coregistration des images, les données en OCT et en fluorescence sont acquises simultanément [437, 438]. L'OCT génère des images volumétriques en 3D de chaque tranche de tissus, alors que la microscopie confocale en fluorescence fournit des images en 2D du plan focal. Après l'acquisition, les images volumétriques en OCT et images en confocale sont réassemblées avec les acquisitions adjacentes afin d'obtenir une reconstruction 3D digitalisée de l'artère entière au moyen d'algorithmes mathématiques spécifiques [437]. L'OCT fournit ainsi une carte anatomique à haute résolution du vaisseau et la juxtaposition des images de microscopie confocale nous renseigne sur la composition moléculaire des parois. Le système est également compatible avec l'histologie conventionnelle puisque les tranches de tissus provenant du vibratome peuvent être récupérées dans l'ordre correspondant à l'architecture de l'artère/organe pour des fins de colorations standards.

# HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

## 1. Hypothèses

Puisque les modalités d'imagerie invasives par cathéter actuellement utilisées dans les essais cliniques sont limitées à l'analyse des caractéristiques morphologiques de la plaque d'athérosclérose et ne permettent à elles seules d'estimer le risque de survenue de rupture, nous supposons que :

- L'utilisation d'un cathéter d'imagerie bimodal combinant l'ultrasonographie (IVUS) et la fluorescence proche infrarouge (NIRF) permettra de surmonter les limitations actuelles de l'imagerie invasive en évaluant simultanément la composition et l'activité inflammatoire de la plaque par ciblage *in vivo* des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM)-1 et des fibres de collagène de type-I non polymérisées;
- L'injection locale et en faible concentration de deux sondes moléculaires ciblant ICAM-1 et le collagène de type-I non polymérisé et marquées par différents fluorophores permettra d'obtenir un signal NIRF *in vivo* au sein de la plaque d'athérome de modèles animaux distincts et de le quantifier;
- Le développement d'une nouvelle plateforme d'histologie massive 3D *ex vivo* permettra d'évaluer la morphologie de la paroi artérielle à l'échelle microscopique, de même que l'activité fonctionnelle de la plaque par colocalisation du signal NIRF dans la plaque, ce qui pourrait devenir l'étalon-or pour l'interprétation d'images acquises *in vivo* dans des études futures en substituant à l'histologie conventionnelle;
- La combinaison de ces technologies innovantes permettrait d'identifier les biomarqueurs morphologiques et fonctionnels de vulnérabilité de la plaque par meilleure compréhension des processus immunobiologiques impliqués dans les différents stades de l'athérogenèse.

## 2. Objectif principal

Le projet de recherche a pour but de démontrer la faisabilité d'une technique d'imagerie moléculaire invasive innovante par cathéter bimodal IVUS-NIRF suivant l'injection locale de traceurs d'imagerie ciblant spécifiquement ICAM-1 et les fibres de collagènes de type-I non polymérisées dans deux modèles animaux athérosclérotiques distincts.

### 2.1. Objectifs secondaires

- Démontrer la faisabilité de la technique d'imagerie invasive par cathéter dans l'aorte abdominale de lapins athérosclérotiques, de même que dans les artères coronaires de porcs diabétiques et athérosclérotiques;
- Démontrer la sensibilité et la spécificité du signal en fluorescence détecté par imagerie invasive IVUS-NIRF *in vivo* suivant l'injection d'une faible concentration des traceurs moléculaires ciblant ICAM-1 et les fibres de collagène type-I non polymérisées au site d'une plaque d'athérome;
- Colocalisation du signal en fluorescence *in vivo* de ICAM-1 dans les artères coronaires de porcs à l'aide d'une plateforme d'histologie massive 3D *ex vivo*.

# MÉTHODOLOGIE

## 1. Modèles animaux

Afin de réaliser les protocoles expérimentaux de recherche en athérosclérose, deux modèles animaux furent développés : (1) le lapin athérosclérotique consistant en la désendothélialisation de l'aorte abdominale suivie de l'instauration d'une diète enrichie en gras et; (2) le porc miniature de race Yucatan diabétique sous diète riche en cholestérol.

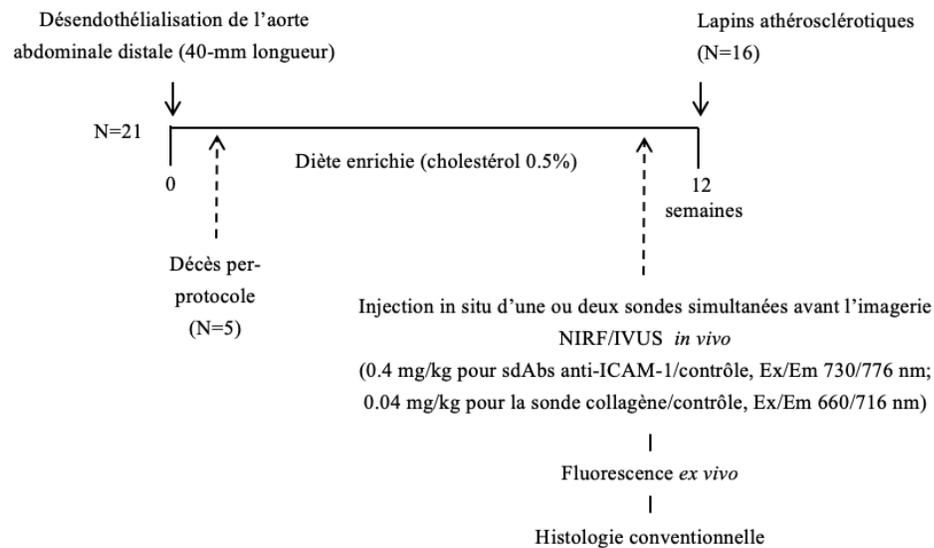
### 1.1. Lapins athérosclérotiques

Un total de 21 lapins males New Zealand White, âgés entre 12-13 semaines et pesant 3 kg (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada), ont subi une dénudation au ballon de l'aorte abdominale distale à temps 0. Par la suite, une diète riche en cholestérol (0.5% cholestérol, Harlan Teklad Diets, Madison, WI) fut instaurée pour 12 semaines consécutives (Figure 42). Un total de 5 lapins athérosclérotiques sont décédés per-protocole.

#### 1.1.1. Dénudation de l'aorte abdominale

Un cathéter introducteur 5 French (F) (Cordis Corporation, Miami, FL, E-U) fut introduit dans l'artère carotide droite sous anesthésie générale (aceprozamine (1 mg/kg intramusculaire (IM), buprénorphine (0.01 mg/kg IM) et isoflurane inhalé (4% v/v, Baxter, Deerfield, IL)). Une angiographie initiale de l'aorte abdominale (Siemens, Canada) fut réalisée en introduisant un cathéter porteur Judkins droit (JR) 4.0 (Cordis Corporation, Miami, FL, É-U) dans l'aorte sur un fil guide 0.014 pouces (Abbott Vascular, Santa Clara, CA). Le diamètre minimal interne (MLD) de l'aorte abdominale était mesuré sur une image en télédiastole par analyse quantitative coronaire (QCA; Syngo software, ARTIS Siemens, Canada) afin de sélectionner la taille appropriée du ballon d'angioplastie correspondant à un ratio ballon/artère de 1.1 à 1.2 :1. Sous guidance fluoroscopique, la désendothélialisation au ballon (Boston Scientific, Marlborough, MA) était réalisée sur

40-mm à partir de la portion distale de l'aorte abdominale, consistant en trois passages consécutifs, à 30 secondes d'intervalle, avec le ballon d'angioplastie gonflé à 10 atmosphères (atm) pendant 30 secondes. Après la dénudation, le cathéter introducteur était retiré et l'artère carotide droite ligaturée. Les soins post-opératoires prodigués consistaient en un monitoring strict des signes vitaux et du comportement de l'animal. L'administration sous-cutanée de buprénorphine (0.02 mg/kg) et de kétoprofène (2mg/kg) immédiatement après la procédure et à 24 h a permis d'assurer une analgésie adéquate. Afin de prévenir la survenue d'infection post-opératoire, une dose prophylactique de Borgal (67 mg/kg) était administrée par voie sous-cutanée après la chirurgie, en plus de l'application de pansements stériles sur la plaie. Les sutures chirurgicales étaient examinées sur une base quotidienne jusqu'à guérison complète de la plaie.



**Figure 42.** Protocole d'imagerie des lapins athérosclérotiques ayant subi une dénudation au ballon de l'aorte abdominale distale. Abréviations : Ex, excitation; Em, émission; IVUS, intravascular ultrasound; NIRF, near-infrared fluorescence; sdAbs, single-domain antibody.

## 1.2. Porcs miniatures diabétiques

Un total de 8 porcs mâles diabétiques de race Yucatan (Sinclair Laboratories, Missouri, É-U), âgés de 7 mois et pesant environ 25 kg, ont été utilisés pour les fins de l'étude. Dès leur

arrivée, tous les animaux ont été placés en quarantaine à l'animalerie de l'Institut de cardiologie de Montréal (ICM) selon les règlements d'importation animale de l'Agence canadienne de l'inspection des aliments (ACIA). L'induction du diabète de type 1 par injection d'alloxane fut réalisée au préalable par la compagnie Sinclair Laboratories chez tous les animaux de l'étude à 5 mois de vie.

### 1.2.1. **Contrôle glycémique**

Au cours de la période d'acclimatation des porcs miniatures (5-7 jours suivant leur arrivée à l'ICM), de même que lors de la période de transition de la diète à haute teneur en cholestérol, la glycémie capillaire à l'oreille était mesurée deux fois par jour avant les repas jusqu'à l'atteinte d'une stabilité des doses d'insuline administrées. Les taux de glycémie capillaire visées étaient entre 17.0 – 25.0 mmol/L. A l'atteinte d'une stabilité des apports quotidiens en diète enrichie, la glycémie était mesurée sur une base hebdomadaire afin de s'assurer du maintien de celle-ci, ou en présence d'un changement de comportement d'un animal (léthargie, désorientation, diminution de l'appétit, troubles d'équilibre, tremblements, convulsions et coma). En cas d'altération du comportement de l'animal associé à un taux de glucose sérique élevé, une dose d'insuline 0.1 U/kg sous-cutané (mélange d'insuline R (1/3 dose) et insuline NPH (2/3 dose) était administrée à l'animal suivant un protocole préétabli avec un monitoring étroit de la glycémie dans les heures subséquentes (annexe 1).

### 1.2.2. **Diète**

Tous les animaux ont été nourris avec une diète à haute teneur en gras (20% lard, 2% cholestérol et 1.5% cholate de sodium) afin d'induire un état d'hypercholestérolémie (Modified Tekland Miniswine diet TD.150234, Harlan Laboratories Inc., Wisconsin, É-U). La diète a débuté dès l'arrivée des porcs miniatures à l'ICM et se poursuit pendant une durée variant entre 22 à 41 semaines, soit jusqu'à l'euthanasie des animaux.

### 1.2.3. Ports vasculaires

Tous les porcs miniatures étaient munis de 2 ports vasculaires veineux permanents en titane préalablement implantés chirurgicalement par cathétérisme des veines jugulaires externes droite et gauche par la compagnie Sinclair Laboratories (Missouri, É-U). Afin de maintenir la perméabilité des accès vasculaires veineux pendant la durée complète du protocole, ceux-ci étaient irrigués avec injection de 3 mL de Taurolidine-citrate (Access Technologies & Solomon Scientific, Illinois, É-U) sur une base hebdomadaire, selon une technique aseptique préalablement établie par la compagnie Sinclair (Missouri, É-U). Afin de minimiser le stress généré par la procédure, l'administration d'isoflurane 0.5-1.5% via un masque facial était appliqué à l'animal pour toute la durée de la procédure.

### 1.2.4. Prélèvements sanguins

Un prélèvement sanguin de 1-2 mL via un port vasculaire veineux permanent était réalisé sur une base mensuelle à partir du temps 0 afin de mesurer différents biomarqueurs sériques tels que le bilan lipidique complet (cholestérol total, triglycérides, LDL, HDL, non-HDL cholestérol), formule sanguine complète, protéine C réactive, bilan hépatique complet (transaminases, phosphatase alcaline, glutamyl-transpeptidases), la créatinine, les électrolytes, la glycémie et le niveau d'insuline endogène. Des tubes ont été prélevés et conservés à -20°C pour analyses ultérieures.

## 2. Sondes moléculaires

### 2.1. ICAM-1

Un anticorps à domaine unique (sdAb)  $V_{HH}$  anti-ICAM-1 a été synthétisé par immunisation d'un lama mâle par l'équipe de Dr Abedelnasser Abulrob du Conseil National de Recherches Canada (CNRC). Une banque de  $V_{HH}$  a été construite et une sélection fut réalisée en fonction de leur affinité pour ICAM-1, tel que décrit précédemment [439]. Après quatre cycles de biopanning contre un recombinant ICAM-1 humain, les  $V_{HH}$  spécifiques à ICAM-1 ont été identifiés par ÉLISA-phage. Des séquences  $V_{HH}$  identifiées par séquençage

ont été clonées dans un vecteur d'expression pSJF2 et les V<sub>H</sub>H ont été exprimés dans des bactéries TG1, tel que décrit précédemment (Brevet US : 8 623 369 B2) [439]. Les anticorps anti-ICAM-1 ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) et leurs affinités de liaison furent déterminées par résonance des plasmons de surface [439]. Les sdAb purifiés ont été marqués au fluorophore IR800CW (LI-COR Biosciences, MA, É-U) pour l'imagerie NIRF. Un test par ELISA a été utilisé afin de confirmer la réactivité des sdAb avant et après le marquage. Les puits d'une plaque Nunc98 ont été remplis par un recombinant humain ICAM et bloqués avec une solution tampon StartingBlock™ (ThermoFischer Scientific, MA, É-U)). Des dilutions en séries de sdAb furent ajoutées aux puits et incubées pendant 1h à température ambiante. Des liaisons spécifiques de sdAb ont été détectées par l'anticorps anti-His conjugué au HRP de lapin (Bethyl Laboratories, Tx, É-U), la couleur a été développée par addition du substrat KPL (KPL Gaithersburg, MD, É-U) et la plaque a été analysée à 450 nm ± 33 [440]. Des puits sans antigène et recouverts d'ICAM-1 mais avec V<sub>H</sub>H non apparentés ont été utilisés comme témoins.

## 2.2. Collagène

La sonde dérivée d'un peptide liant le collagène, GEWTWDDATKTWTWTE, ciblant spécifiquement le collagène de type-I non polymérisé, fut développée par l'équipe de Dr Feng Ni du CNRC (Publication du brevet US : 2016/0168210 A1). La partie peptidique de la sonde GEWTWDDATKTWTWTEGGC a été purifiée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) à partir de matériaux obtenus par synthèse peptique sur support solide et marquée via le résidu cystéine avec l'Alexa-660-monomaléimide (Thermo Fisher Scientific, MA, É-U) pour l'imagerie NIRF. Le peptide de contrôle négatif, ETVTFTKTADDYTSEGGGC, a été dérivé d'un peptide non liant GEWTYDDATKTFTVTE dont le résidu tryptophane fut remplacé par la sérine suivi d'une inversion des séquences (Publication du brevet US : 2016/0168210 A1). Le peptide de contrôle a également été conjugué à l'Alexa-660-monomaléimide. Les deux sondes ont été purifiées davantage par CLHP après conjugaison au fluorophore et séchées en poudre avant

reconstitution dans une solution saline physiologique. Les concentrations finales des sondes peptidiques ont été déterminées en utilisant le poids sec des poudres peptidiques.

### **3. Cathéter d'imagerie IVUS-NIRF**

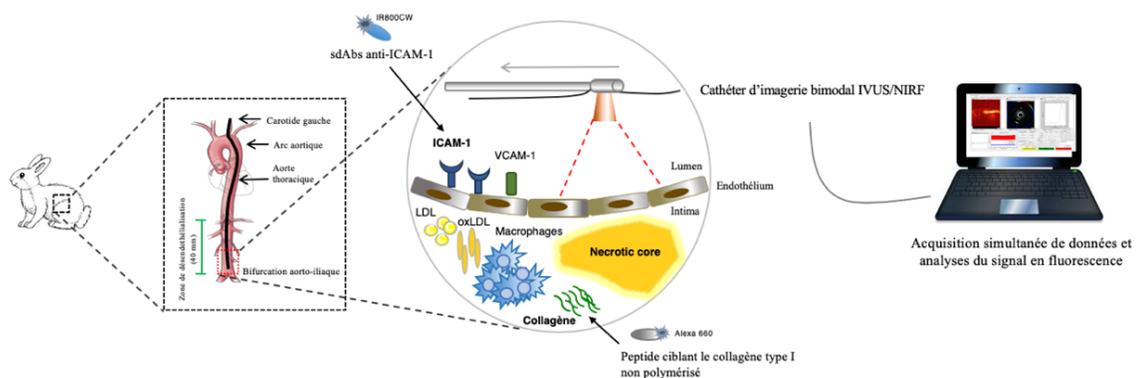
Le cathéter d'imagerie intravasculaire bimodal IVUS-NIRF utilisé dans les études a été préalablement décrit par Abran et collègues [293, 302]. La technologie consiste en une fibre optique de 400  $\mu\text{m}$  pouvant générer de l'imagerie en fluorescence à 360 degrés et de la photoacoustique, combinée à un transducteur à ultrasons (extrait du cathéter Revolution® IVUS 45 MHz commercialisé Philips, Amsterdam, Pays-Bas) pour l'imagerie acoustique et la détection de signaux en photoacoustique. Le cathéter, compatible en 5 F, dispose d'un diamètre de 1.4 mm et est connecté à un circuit électrique permettant de synchroniser les acquisitions en imagerie par fluorescence et IVUS de par un retrait automatisé rotationnel ayant une vitesse d'angulation de 30 révolutions/secondes. La vitesse des retraits automatisés est de 0.5 mm/s et les acquisitions sont de 10 images/s, avec une longueur de retrait total du cathéter de 100 mm. Les données d'imagerie brutes sont directement transférées à un ordinateur disposant d'un logiciel Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA) avec interface programmée permettant de filtrer les signaux, de reconstruire et afficher en temps réel les images pendant l'acquisition (Figure 43). Le système IVUS-NIRF dispose de lasers et filtres interchangeable selon les propriétés du fluorophore à imager. L'excitation des tissus était réalisée avec une diode laser 730-nm pour la sonde marquée à IR800CW ou une diode laser 660-nm pour la sonde marquée par Alexa-660. Le signal fluorescent émis par le tissu était détecté par un tube photomultiplicateur (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), combiné à un filtre de 776-nm (IR800CW) ou à un filtre de 716-nm  $\pm$  20 nm (Alexa-660).

### **4. Imagerie intravasculaire *in vivo* par cathéter IVUS-NIRF**

#### **4.1. Lapins**

Sur les 21 lapins, cinq sont décédés après la procédure de dénudation au ballon et furent exclus de l'étude; 16 lapins ont été utilisés pour les fins de procédures d'imagerie

intravasculaire *in vivo* à 12 semaines. Sous anesthésie générale, un introducteur 5 F (Cordis Corporation, Miami, FL, E-U) a été utilisé afin de canuler l'artère carotide gauche (Figure 43). Sous guidance fluoroscopique, les sondes moléculaires ont été injectées au site de dénudation de l'aorte abdominale distale, en amont de la bifurcation aorto-iliaque, à l'aide d'un ballon microporeux semi-compliant de 20-mm de longueur (ClearWay™ RX, Atrium Medical, NH, É-U) inséré sur un guide 0.014 pouces (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, É-U). La dose administrée pour la sonde ciblant le collagène variait entre 0.07-0.12 mg/lapin (préparée dans un volume final de 2.5 mL), dose qui fut déterminée en fonction de la redistribution systémique chez le rat ou la souris correspondant à 0.25-0.5 mg/kg/sonde (Brevet E-U : 2016/0168210 A1). Le dosage des sondes d'anticorps anti-ICAM-1 était de 0.4 mg/kg/lapin. La dimension du ballon poreux était déterminée en fonction du MLD de l'aorte abdominale distale mesurée en télédiastole par QCA (Syngo software, ARTIS Siemens, Canada) afin d'obtenir un ratio ballon/artère de 1.1-1.2 :1. L'infusion était réalisée sur une période de 90 secondes, avec gonflement du ballon microporeux à 4 atmosphères, suivi d'une irrigation avec 1.5 mL de solution saline 0.9%. L'injection *in situ* d'une seule sonde fut réalisé chez six lapins, soit l'une des sondes moléculaires ciblant ICAM-1, le collagène type-1 non polymérisé ou l'un des deux contrôles négatifs. Dix lapins ont eu une l'injection simultanée de deux sondes combinant soient les deux traceurs moléculaires ou les deux contrôles négatifs. Immédiatement après l'injection, le cathéter d'imagerie intravasculaire était inséré sur un guide 0.014 pouces et les acquisitions par imagerie IVUS-NIRF *in vivo* de l'aorte abdominale distale était réalisée à intervalle de 10 minutes, sur une période de 40 minutes. Lors de l'injection simultanée de deux sondes, deux retraits automatisés consécutifs du cathéter étaient réalisés à tous les temps d'acquisition, en changeant les filtres optiques afin de détecter le signal en fluorescence des deux traceurs. Un total de 5 retraits sériés du cathéter a été effectué dans le même segment artériel pour chaque lapin, sur une longueur totale de 50-mm à partir de la bifurcation aorto-iliaque comme point de repère anatomique proximal (Figure 43). Des prélèvements sanguins furent réalisés par l'introducteur (1-2 mL) avant chaque acquisition afin d'évaluer la cinétique des sondes par fluorescence *ex vivo*. A la fin des expériences, les animaux étaient sacrifiés et l'aorte était réséquée.



**Figure 43.** Schématisation de l’injection *in situ* des sondes dans l’aorte abdominale distale, suivie de l’imagerie intravasculaire par cathéter bimodal IVUS-NIRF. Abréviations : sdAbs, single-domain antibody; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IVUS, intravascular ultrasound, LDL, low-density lipoprotein; NIRF, near-infrared fluorescence; oxLDL, LDL oxydé; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1.

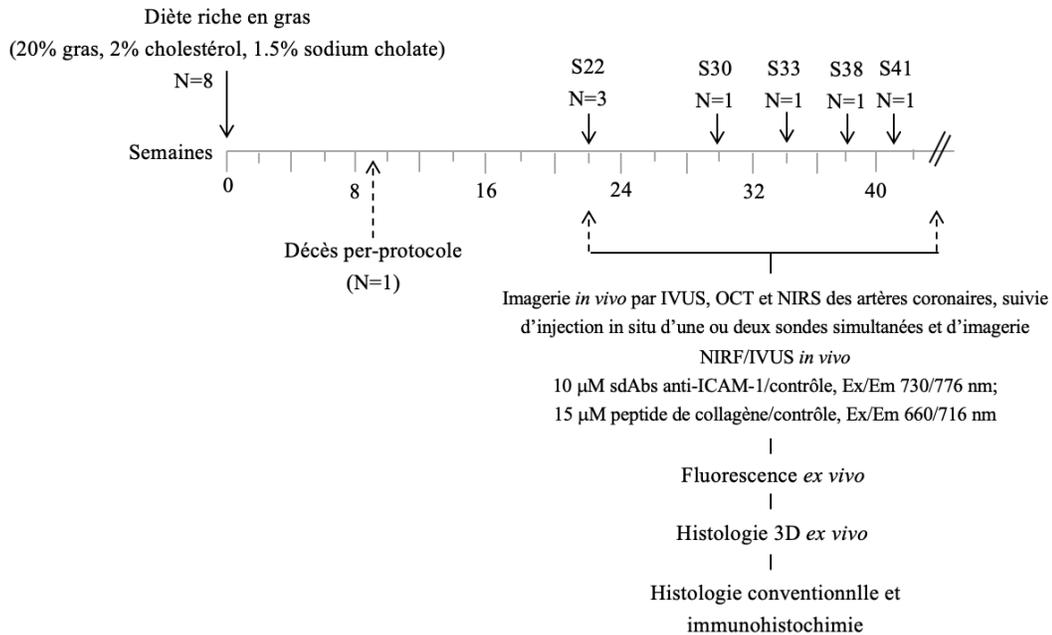
## 4.2. Porcs

Parmi les 8 porcs miniatures à l’étude, un décès est survenu per-protocole des suites d’un choc septique causé par la bactérie *Streptocoque suis*. Sept porcs diabétiques furent soumis à de l’imagerie invasive par cathéter à différents temps donnés (Figure 44).

### 4.2.1. Anesthésie et préparation de l’animal

Les porcs étaient à jeun 18 heures avant l’intervention. Une prémédication par voie orale était administrée la veille de l’intervention, combinant de l’aspirine 320 mg et une dose de charge en clopidogrel 600 mg; une dose d’entretien de clopidogrel 75 mg était administrée le jour du cathétérisme cardiaque afin d’éviter toute thrombose coronarienne durant la procédure. Un examen physique sommaire était réalisé préalablement à l’anesthésie afin de s’assurer du bien-être des animaux. L’induction de l’anesthésie était effectuée par injection de Télazol 6 mg/kg IM. En début de procédure, l’animal était intubé et maintenu sous anesthésie générale par inhalation d’isoflurane 0,5-1,5% à débit contrôlé par le respirateur. Sous anesthésie, 2 ponctions fémorales étaient réalisées selon la technique de Seldinger avec mise en place de deux introducteurs

fémoraux 6 F veineux et artériel. Un salin isotonique 0,9% était administré tout au long de la procédure à un débit de 5-10 mL/kg/heure par voie veineuse fémorale. Un monitoring continu périprocédural des signes vitaux était rigoureusement réalisé, soient la tension artérielle, fréquence cardiaque, la saturation en O<sub>2</sub>, le rythme respiratoire, la température rectale et l'électrocardiogramme (MacLab, GE Healthcare, É-U).



**Figure 44.** Protocole d'imagerie des porcs diabétiques et athérosclérotiques à différents temps donnés. Abréviations : Ex, excitation; Em, émission; IVUS, intravascular ultrasound, NIRF, near-infrared fluorescence; NIRS, near-infrared spectroscopy; OCT, optical coherence tomography; sdAbs, single-domain antibody; S, semaines; 3D, 3-dimensions.

#### 4.2.2. L'imagerie intracoronarienne *in vivo*

Afin d'éviter la survenue d'arythmie ventriculaire, une dose intraveineuse de lidocaïne (bolus 2-4 mg/kg) était administrée préalablement au cathétérisme des artères coronaires. Avant l'introduction d'un premier cathéter, une mesure du temps de céphaline activée (TCA) était effectuée afin d'avoir une valeur de base. Par la suite, une dose de charge d'héparine non fractionnée (300 U/kg) était administrée avec monitoring subséquent du TCA aux 45 minutes. Une valeur de TCA supérieure à 4 fois la valeur de

base était visée afin d'éviter la formation de thrombus au niveau des cathéters. Une dose de nitroglycérine (200 µg) était initialement administrée via le cathéter porteur dans les artères coronaires afin d'effectuer une vasodilatation préalablement à l'imagerie. Une dose supplémentaire intracoronarienne pouvait être administrée (100 µg) en cas de vasospasme. Une angiographie sélective était réalisée en début de procédure par approche fémorale avec un cathéter porteur Amplatz right (AR) 2.0 8F (Cordis Corporation, Miami, FL, É-U) pour la coronaire gauche et JR 3.0 8F (Cordis Corporation, Miami, FL, É-U) pour la coronaire droite. Les techniques d'imagerie endovasculaires par IVUS (cathéter Revolution® 45 MHz, Philips Healthcare, É-U) et OCT (cathéter Dragonfly™, Abbott Vascular, Illinois, É-U) ont été réalisées dans les 3 artères coronaires épigardiques principales de chaque animal (coronaire droite, tronc commun, IVA et artère circonflexe) avant l'imagerie en fluorescence lorsque l'état hémodynamique de l'animal le permettait. Les artères filles ont été exclues de l'analyse. Suivant l'introduction sélective d'un guide 0,014 pouces (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, É-U) dans une artère coronaire, un cathéter d'imagerie était inséré sur le guide et avancé jusqu'à la portion distale du vaisseau. Les bifurcations et l'origine des coronaires ont servi de points de référence pour la coregistration des images acquises par angiographie, histologie 3D et l'histopathologie. Deux reculs automatisés du cathéter étaient réalisés sur toute la longueur du vaisseau à une vitesse donnée au moyen d'appareils dédiés à cet effet. Les images obtenues par IVUS, OCT et IVUS-NIRF ont été digitalisées en format DICOM.

Sous guidance fluoroscopique, les sondes moléculaires ont été injectées dans la portion proximale de l'artère coronaire, au site d'une plaque d'athérome, à l'aide d'un ballon microporeux semi-compliant de 20-mm de longueur (ClearWay™ RX, Atrium Medical, NH, É-U) inséré sur un guide 0.014 pouces (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, É-U) [441]. Une seule sonde était injectée à un site donné. La dose administrée pour la sonde ciblant le collagène était de 14.9 µM/porc et de 15.56 µM/porc pour le contrôle négatif (volume final préparée dans un volume final de 3.0 mL), et le dosage des sondes d'anticorps anti-ICAM-1 et de son contrôle respectif était de 10 µM/porc. La dimension du ballon poreux était déterminée en fonction du MLD de l'artère coronaire proximale

mesurée en télédiastole par QCA (Syngo software, ARTIS Siemens, Canada) afin d'obtenir un ratio ballon/artère de 1.1-1.2 :1. L'infusion était réalisée sur une période de 90 secondes, avec gonflement du ballon microporeux à 4 atmosphères, suivi d'une irrigation avec 1.5 mL de solution saline 0.9%. L'imagerie bimodale IVUS-NIRF était réalisée immédiatement suivant l'infusion de la sonde, à raison de deux retraits automatisés sur 50-mm de longueur. Un total de 7 sondes ICAM-1 ont été injectées dans différents segments d'artères coronaires épicaudiques, de même que 6 contrôles négatifs ICAM-1, 4 sondes ciblant le collagène et 1 contrôle négatif correspondant.

#### 4.2.3. L'Euthanasie

À la fin des procédures d'imagerie intracoronarienne, les animaux ont été euthanasiés par exsanguination sous anesthésie générale. Le cœur de l'animal était explanté afin de procéder à l'excision des artères coronaires pour des fins d'imagerie *ex vivo*.

### 5. Analyse des images acquises par imagerie IVUS-NIRF *in vivo*

Un algorithme de correction d'atténuation du signal a été appliqué sur les acquisitions *in vivo*, tel que décrit précédemment [302], afin de compenser l'amplitude du signal en fluorescence avec la distance entre le cathéter d'imagerie et la paroi artérielle.

### 6. Imagerie en fluorescence *ex vivo*

#### 6.1. Lapins

Après l'euthanasie et l'infusion d'une solution saline, les aortes ont été réséquées, ouvertes et allongées manuellement sur une boîte de pétri de cire noire remplie d'une solution saline 0.9%, afin de réaliser de l'imagerie en fluorescence *ex vivo* en face à 37°C au moyen d'un système commercialisé d'imagerie en épifluorescence (IVIS Lumina II, PerkinElmer,

MA, É-U). Les paramètres utilisés étaient les suivants : Excitation (Ex) / Émission (Em) 745 ± 20 / 800 nm ± 20 nm pour la sonde anti-ICAM-1 et 640 ± 20 / 720 ± 20 nm pour la sonde ciblant le collagène, un champ de vision de 10 cm, F/stop 1, Binning (M) 4/2, temps d'excitation de 20 s. Les valeurs d'intensité en fluorescence (intensité/cm<sup>2</sup>) de la région d'intérêt (i.e. 20-mm de la région injectée dans l'aorte abdominale distale) furent analysées suivant l'utilisation d'un logiciel de traitement d'images digitalisé (Lumia II Living Image 2.0). Après chaque imagerie, les régions d'intérêt (ROI; 15 mm de longueur) étaient enrobées dans le Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, MA, É-U) et préservées à -80°C pour validation microscopique subséquente des résultats d'imagerie *ex vivo*. Le pourcentage moyen de rétrécissement des tissus par déshydratation fut estimé entre 25-30%, selon l'emplacement des branches filles qui furent utilisés comme points de repère, de même que la longueur du retrait automatisé du cathéter.

## 6.2. Porcs

Après euthanasie des animaux, le cœur était prélevé et les artères coronaires étaient préalablement perfusées avec 1 L de solution saline, suivi d'une solution tampon 10% formaldéhyde. Les artères coronaires ont été explantées suivant les points de repères préétablis à l'angiographie (artères coronaires filles, bifurcations) puis placées dans l'agarose. Une goutte d'encre de Chine fut appliquée à l'ostium de chaque coronaire afin de pouvoir corréler les images acquises en histologie 3D (marqueur proximal).

## 7. Histologie 3D *ex vivo* des artères coronaires porcines

L'histologie 3D *ex vivo* des artères coronaires de porc fut réalisée par combinaison de l'OCT à un microscope en fluorescence confocale, telle que validée par Tardif et collègues [437]. Après l'euthanasie des animaux, les artères coronaires ont été disséquées et fixées dans une solution tampon au formaldéhyde 10%. Afin d'imager le vaisseau sanguin entier, ceux-ci ont été placés à la verticale dans un moule à impression 3D et incorporés dans un gel d'agarose. Le moule a ensuite été placé dans un réservoir d'eau, la surface de l'artère se trouvant sous l'objectif du microscope OCT/microscope confocale. Le réservoir était fixé à un système motorisé permettant de déplacer

l'échantillon dans toutes les directions avec une précision de l'ordre du micromètre. Puisque la taille des artères coronaires dépassait le champ de vision du microscope (2,5 x 2,5 mm), il fallait déplacer celles-ci horizontalement, dans le plan X-Y, afin d'obtenir une image complète de la coupe. Une fois l'acquisition d'une tranche de tissu terminée, un vibratome découpait finement une section de l'artère (tranches de 200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur), à partir du marqueur distal jusqu'au marqueur proximal, et le moteur Z plaçait la tranche suivante sous l'objectif à l'aide d'un algorithme permettant de détecter l'interface eau/tissu. Le processus était automatiquement répété jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement imagé. La reconstruction 3D de l'artère complète fut réalisée par assemblage en mosaïque des acquisitions adjacentes d'images volumétriques acquises en OCT pour former un volume complet. Des algorithmes mathématiques de Python ont été utilisés pour le chevauchement entre les acquisitions volumétriques, l'équation de Laplace pour fusionner les bords et des algorithmes de correction du phénomène d'extinction par Beer-Lambert [437]. Les données acquises en microscopie confocale ont ensuite été superposées aux données OCT, fournissant une carte anatomique à haute résolution du vaisseau avec le signal en fluorescence généré par les traceurs moléculaires à l'étude.

## 8. Histologie conventionnelle

Les coupes d'artères coronaires de 200  $\mu\text{m}$  furent récupérées après l'histologie 3D et retranchées afin d'obtenir des sections de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. L'agarose fut retirée manuellement et à l'aide de solutions de déshydratation avant que les coupes tissulaires soient enrobées dans la paraffine. Des sections d'aortes abdominales de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont également été coupées pour des fins de colorations tissulaires à partir de cryosections de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. La morphométrie fut décrite par coloration au trichrome de Masson, incluant la quantification du collagène et de la fibrose (bleu). La coloration par Von Kossa a été réalisée pour identifier la présence de calcium dans la néointima et la média (brun), alors que l'Oil red O (ORO) a permis d'identifier les lipides présents dans la néointima et la média (rouge). Les plaques ont été classifiées selon le stade d'évolution de l'athérogenèse décrit par l'*American Heart Association (AHA)* [176].

## 9. Immunohistochimie de ICAM-1

### 9.1. Aortes abdominales de lapins

Les cryosections de 10 µm d'épaisseur ont été obtenues à partir d'aortes de lapins fraîchement congelées. La microscopie en fluorescence des coupes d'aortes de la région d'intérêt a été réalisée avec le microscope Zeiss LSM 7 Duo (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Canada) afin de visualiser la distribution du signal NIRF de la sonde anti-ICAM-1 (Ex/Em, 638/755 nm) et de l'anticorps anti-ICAM-1 (Ex/Em, 544/649 nm). La colocalisation du signal fut réalisée en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-lapin ICAM-1, clone Rb2/3 (gracieusement fourni par Pr Miron Cybulsky, Université de Toronto, Canada). Les coupes ont été fixées pendant 5 minutes dans l'acétone à -20°C et incubées durant la nuit avec l'anticorps primaire à 4°C, suivi d'un marquage avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris IgG1 marqué à Alexa Fluor 555 (A-21127, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, É-U).

### 9.2. Artères coronaires porcines

Les sections d'artère coronaire (200 µm d'épaisseur) ont été récupérées du vibratome dans l'ordre correspondant à l'architecture de l'artère pour des fins de colorations histopathologiques et pour analyse par immunohistochimie. L'excès de gel d'agarose a été retiré manuellement, puis fixé dans une solution tampon à 10% de formol pour l'histologie standard. Les échantillons ont été coupés en sections de 6 µm d'épaisseur et déparaffinés dans des bains de xylène et d'éthanol, et l'activité de la peroxydase endogène a été désactivée dans une solution de peroxyde d'hydrogène 30%. La pré-incubation des tissus avec 10% de sérum provenant de l'espèce utilisée pour produire les anticorps secondaires a permis d'éviter la liaison non spécifique des anticorps primaires. Des coupes d'artères coronaires ont ensuite été exposées à l'anticorps primaire de chèvre anti-ICAM-1 (M-19) polyclonal SC-1511 (1/500 ; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), suivi d'une incubation avec l'anticorps anti-chèvre biotinylé (1 : 400) (Vector Laboratories ; Burlingame, Californie, Canada). Le marquage à la peroxydase a été obtenu à l'aide d'un complexe avidine / biotine (kit ABC ; Vector) et la

visualisation des anticorps a été établie après une exposition à une solution de 3,3-diaminobenzidine (kit DAB ; Vector). La coloration par l'hématoxyline de Mayer a été réalisée, puis les coupes de tissus furent mises dans une solution permount (Fisher Scientific, Hampton NH, USA). Les images ont été recueillies à l'aide d'un microscope à champ clair et acquises sous un grossissement de 200X de chaque section colorée.

## 10. Analyses statistiques

Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés afin de comparer l'intensité du signal en fluorescence entre le groupe avec traceur moléculaire et le groupe contrôle pour l'imagerie *in vivo* et *ex vivo* en utilisant le logiciel Prism 8.0 (GraphPad Software, Sand Diego, CA, É-U). Les tests de corrélation de Pearson ont été utilisés pour comparer l'intensité du signal NIRF au pourcentage de ICAM-1, de même que pour établir la corrélation entre signal NIRF *in vivo* et *ex vivo* et pour évaluer la corrélation entre les données biologiques chez les porcs et la classification du stade d'évolution des plaques (AHA). Les valeurs de  $P < 0.05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

## 11. Éthique animale

L'utilisation d'animaux pour des fins de recherche en athérosclérose a été préalablement approuvée par le comité d'éthique animale (CDA) du Centre de recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal, conformément aux directives du Conseil canadien de protection des animaux (CCAC, Canadian Council on animal care).

# ARTICLES

## 1. Étude #1

### **In vivo near-infrared fluorescence imaging of atherosclerosis using local delivery of novel targeted molecular probes.**

Marie-Jeanne Bertrand, Maxime Abran, Foued Maafi, David Busseuil, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Pascale Geoffroy, Pier-Luc Tardif, Abedelnasser Abulrob, Mehdi Arbabi-Ghahroudi, Feng Ni, Martin Sirois, Éric Rhéaume, Philippe L'Allier, Frédéric Lesage, Jean-Claude Tardif.

Nature Scientific Reports, 2019; 9 :2670

#### Apport original et contribution des co-auteurs

La contribution du premier auteur, Marie-Jeanne Bertrand, est majoritaire puisqu'elle a réalisé toutes les expérimentations techniques relatives à l'étude et a entièrement rédigé le manuscrit. Dr Marie-Jeanne Bertrand, Dr Philippe L'allier, Dr Éric Rhéaume, Dr Frédéric Lesage et Dr Jean-Claude Tardif ont participé à l'élaboration des expérimentations. Dr Maxime Abran, Dr Philippe L'Allier, M. Foued Maafi, Dr Nolwenn Merlet, Mme Téodora Mihalache-Avram, Mme Pascale Geoffroy, Dr David Busseuil et M. Pier-Luc Tardif ont également réalisé les expérimentations par cathéter. Dr Feng Ni a développé et synthétisé le peptide liant le collagène type-1 non polymérisé. Dr Mehdi Arbabi-Ghahroudi et Dr Abedelnasser Abulrob ont développé et synthétisé l'anticorps anti-ICAM-1. Dr Martin Sirois et son laboratoire ont effectué les analyses histologiques. L'étude fut supervisée par Dr Philippe L'Allier, Dr Éric Rhéaume, Dr Frédéric Lesage et Dr Jean-Claude Tardif.

# **IN VIVO NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IMAGING OF ATHEROSCLEROSIS USING LOCAL DELIVERY OF NOVEL TARGETED MOLECULAR PROBES**

Marie-Jeanne Bertrand<sup>1,2</sup>, Maxime Abran<sup>1,3</sup>, Foued Maafi<sup>1</sup>, David Busseuil<sup>1</sup>, Nolwenn Merlet<sup>1</sup>, Teodora Mihalache-Avram<sup>1</sup>, Pascale Geoffroy<sup>1</sup>, Pier-Luc Tardif<sup>1,3</sup>, Abedelnasser Abulrob<sup>4</sup>, Mehdi Arbabi-Ghahroudi<sup>4</sup>, Feng Ni<sup>5</sup>, Martin Sirois<sup>1</sup>, Philippe L. L’Allier<sup>1,2</sup>, Éric Rhéaume<sup>1,2</sup>, Frédéric Lesage<sup>1,3</sup>, and Jean-Claude Tardif<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Montreal Heart Institute, 5000 Belanger street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada

<sup>2</sup> Department of medicine, Université de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada

<sup>3</sup> Département de Génie Électrique et Institut de Génie Biomédical, École Polytechnique de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada

<sup>4</sup> Department of Translational Biosciences, Human Health Therapeutics Research Centre, National Research Council of Canada, 1200 chemin de Montréal, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada

<sup>5</sup> Department of Downstream Processing and Analytics, Human Health Therapeutics Research Centre, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Quebec, H4P 2R2 Canada

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the feasibility and accuracy of a technique for atherosclerosis imaging using local delivery of relatively small quantities (0.04-0.4 mg/kg) of labeled-specific imaging tracers targeting ICAM-1 and unpolymerized type I collagen or negative controls in 13 rabbits with atheroma induced by balloon injury in the abdominal aorta and a 12-week high-cholesterol diet. Immediately after local infusion, *in vivo* intravascular ultrasonography (IVUS)-NIRF imaging was performed at different time-points over a 40-minute period. The *in vivo* peak NIRF signal was significantly higher in the molecular tracer-injected rabbits than in the control-injected animals ( $P < 0.05$ ). *Ex vivo* peak NIRF signal was significantly higher in the ICAM-1 probe-injected rabbits than in controls ( $P = 0.04$ ), but not in the collagen probe-injected group ( $P = 0.29$ ). NIRF signal discrimination following dual-probe delivery was also shown to be feasible in a single animal and thus offers the possibility of combining several distinct biological imaging agents in future studies. This innovative imaging strategy using *in vivo* local delivery of low concentrations of labeled molecular tracers followed by IVUS-NIRF catheter-based imaging holds potential for detection of vulnerable human coronary artery plaques.

## INTRODUCTION

Cardiovascular atherosclerotic events are the leading cause of mortality worldwide [1] and arise most frequently from coronary plaque disruption, which can trigger acute myocardial infarction and sudden cardiac death [2]. Despite our current knowledge of inflammatory and immune processes in atherogenesis, the early detection of vulnerable plaques and the ability to predict plaque rupture in susceptible patients remain an unmet need in clinical practice [3, 4]. Although currently available intravascular imaging modalities enable *in vivo* characterization of morphological parameters of atheroma plaques, they have failed to demonstrate their relevance in preventing acute cardiac events [5-8].

Near-infrared fluorescence (NIRF) is an innovative high-resolution imaging technology that allows visualization of inflammatory processes at the cellular level using target-specific labeled tracers, thus enabling atherosclerosis detection at early stages of the disease [9-11]. The concept of using specific site-targeted contrast agents for *in vivo* detection of vascular pathology was previously demonstrated in a canine arterial thrombi model using ultrasonic contrast agent [12, 13]. In the past decade, NIR-fluorescence catheters have been developed for intravascular imaging that could enable *in vivo* detection of high-risk coronary plaque biomarkers and, consequently, optimize patient stratification and clinical management [14-20]. The current limitations to the clinical translation of NIRF imaging include the lack of clinically approved tracers that target specific features of plaque biology due, in part, to the weak sensitivity to molecular imaging agents, risk of toxicity from systemic administration, costs, labeling and regulatory issues [21]. Indocyanine green (ICG) and methylene blue are near-infrared fluorophore approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and have been used for NIRF imaging in both preclinical and clinical studies. Although Verjans et al. [22] demonstrated ICG deposition in carotid plaque specimens from five patients using *ex vivo* intra-arterial dual-modal optical coherence tomography (OCT) – NIRF imaging, results showed less specific binding of the fluorophore to human plaque macrophages and lipids by comparison to previous data published from rabbit atherosclerotic plaques [23]. The discrepancy of ICG specificity observed between rabbits and human atherosclerotic plaque components could result from the

short systemic half-life of ICG and the low concentration administered to subjects prior to endarterectomy [22].

This preliminary study aimed at overcoming the present limitations of NIRF imaging and addressing the need for a clinically available intravascular molecular imaging modality to accurately and safely target both inflammation and specific atherosclerotic plaque components, an unmet need in clinical practice. Accordingly, the feasibility of a technique of local delivery of imaging agents was evaluated using two newly engineered near-infrared labeled molecular probes to image plaque composition and inflammation using a custom bimodal intravascular ultrasound (IVUS) – NIRF imaging catheter system in atherosclerotic rabbit aortas.

## RESULTS

### **Colocalization of NIRF signal in atherosclerotic plaques.**

Fifteen male New Zealand White (NZW) rabbits underwent balloon denudation in the distal abdominal aorta (40-mm length), followed by a 12-week high-cholesterol diet (0.5% cholesterol). *In vivo* IVUS-NIRF imaging was performed at week 12 following local delivery of labeled NIRF molecular agents targeting ICAM-1 and unpolymerized collagen type I at the injured site of the abdominal aorta (Fig. 1). In order to perform accurate local delivery of targeted molecular probes at the site of the injured abdominal aorta, conventional angiography of the distal aorta was performed to locate the aorto-iliac bifurcation for precise porous-balloon catheter positioning. Figure 2 shows an example of NIRF signal colocalization following local delivery of the collagen-binding peptide probe in the distal abdominal aorta of a diseased rabbit aorta. Figure 2a demonstrates the angiographic location of the balloon injury region (red square) in the distal part of the abdominal aorta, which was the site of local infusion of the molecular imaging agent. Following *in situ* delivery of the imaging tracer, the rabbit aorta was imaged using intravascular IVUS-NIRF imaging that enabled colocalization of *in vivo* NIRF signal with atherosclerotic plaque identified by IVUS (Fig. 2b). We observed that *in vivo* NIRF signal location obtained with the dual-mode imaging catheter matched accurately the signal obtained by *ex vivo* fluorescence reflectance imaging (FRI) imaging of the aorta (Fig. 2c, d). The fluorescence signal was stronger in lipid-rich segments of the aorta, as shown on white light image (Fig. 2e). Staining analysis from sections harboring atheroma plaques revealed that collagen-binding peptide fluorescence colocalized with collagen-rich plaques, as shown on Masson's trichrome staining (Fig. 2f).

### ***Ex vivo* binding of anti-ICAM-1 single-domain antibody (sdAbs) and collagen-binding peptide to antigens in rabbit atherosclerotic plaque.**

Balloon denudation of rabbit abdominal aortas, in addition to atherogenic diet, led to the formation of lipid-rich atheroma plaques, as shown on histopathology sections (Figure 3a). Staining analysis showed the presence of collagen (on Trichrome Masson's staining) in

inflamed plaques, as demonstrated by the presence of Oil Red O (ORO)-positive lipid plaques and neointima (on Hematoxylin and eosin staining). Prior to performing *in vivo* NIRF imaging in experimental atherosclerosis, we confirmed that both NIR-fluorescent molecular probes reacted with antigens in atherosclerotic aorta sections of hypercholesterolemic rabbits. Figure 3b shows focal staining of ICAM-1 localized in the intima of the aorta (merged image), by comparison to very weak signal obtained with the control sdAbs (Fig. 3d). Specific binding of the labeled nanobodies to ICAM-1 at the surface of cellular membranes rather than in the cytoplasm in tumor-necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) activated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was previously demonstrated [24]. Diffuse staining of collagen with the collagen-binding peptide was observed in both the intima and media of rabbit atherosclerotic aorta (Fig. 3c) and staining with the control collagen-peptide probe was negative (Fig. 3e).

#### **Systemic clearance of anti-ICAM-1 sdAbs and collagen-binding peptide following *in vivo* local injection at the site of rabbit injured aorta.**

We assessed blood clearance of both molecular agents and their controls following *in situ* injection at the balloon-induced injury area of rabbit abdominal aorta. Serial heparinized blood samples were taken from the sheath catheter immediately following local delivery of the NIRF probes using a porous balloon and every 10 minutes to perform *ex vivo* fluorescence imaging quantification. The blood clearance kinetics of both anti-ICAM-1 sdAbs (Fig. 4a) and collagen-binding peptide probes (Fig. 4b) demonstrate a rapid systemic decline during the initial 30 minutes, which begins to stabilize at 40 minutes. There was no difference in blood kinetics between the molecular agents and their respective controls. Moreover, simultaneous dual-probe delivery did not alter the systemic clearance of the imaging agents by comparison to single-probe delivery (data not shown). Following local delivery of the imaging tracers, the first pullback performed using the IVUS-NIRF catheter detected a strong saturated NIRF signal *in vivo* that rapidly declined in the first 20 minutes for both probes, followed by a re-increase in signal intensity between 20 to 40 minutes, by comparison to a continuous slow decline of signal intensity of the control probes (Fig. 4c, d). The absence of binding of the control tracers to the arterial wall resulted in a continuous drop in signal intensity at every time-point that was then

undetectable at 45 minutes. The specific binding of molecular tracers to atheroma plaques generated a strong NIRF signal of variable intensity that could be accurately imaged by the intravascular imaging catheter after 40 minutes.

**Comparison between *in vivo* and *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) imaging of rabbit atheroma plaques using both anti-ICAM-1 sdAbs and collagen-binding peptide probes.**

Intravascular imaging was safely performed in all 13 atheromatous rabbits. As both ICAM-1 and unpolymerized type I collagen specific probes bind to rabbit atherosclerotic plaques, we evaluated the feasibility of local injections of these tracers to locate plaque in diseased animals as a potential novel modality for accurate and safe catheter-based NIRF detection. In order to determine the optimal timing for NIRF imaging, dual-modal intracoronary IVUS-NIRF imaging was performed serially following local delivery of molecular probes over a 40-minute period. Based on *in vivo* fluorescence signal stability, IVUS-NIRF imaging analysis acquired at 40 minutes revealed focal NIRF signals within the injured zone following either single (Fig. 5a-d) or dual-tracer infusion (Fig. 5e, f). Specific probe-labeling using IR800CW and Alexa-660, distinct fluorophores with different emission wavelength properties, enabled dual-probe injection and *in vivo* and *ex vivo* NIRF signal differentiation in a single diseased animal. Immediately after *in vivo* IVUS-NIRF imaging, fluorescence reflectance imaging of resected aortas was performed and revealed NIRF activity predominantly in lipid-rich regions visible in white light images of atheroma-bearing aortas, whereby signal intensity tended to correlate with plaque burden. Interestingly, focal and diffuse NIRF signals from non-injured lipid-rich arterial segments were observed in the collagen probe-injected atheroma rabbits. Concordance between *in vivo* and *ex vivo* NIRF signal location was evaluated by comparing NIR-fluorescence signal on intravascular imaging pullbacks and resected aortas using anatomic landmarks, whereas results are displayed with a shift between fluorescence signals due to postmortem tissue shrinkage (average of 25-30%). *In vivo* and *ex vivo* NIRF signals accurately matched in all rabbits for both labeled-specific tracers (Fig. 5a, b, e). By contrast, there were no NIRF signals detected in the control-injected groups (Fig. 5c, d, f), except in 2 collagen probe-injected diseased animals that showed NIRF signal in high-density plaque regions upstream from the

injection site (thoracic and abdominal aorta). For the ICAM-1 targeted probe, the *in vivo* peak NIRF signal was 1.47-fold greater than the control ( $1.47 \pm 0.22$  versus  $1.00 \pm 0.05$ ;  $P=0.032$ ; Figure 5g) and *ex vivo* peak NIRF signal was 4.9-fold greater than the control ( $4.94 \pm 1.73$  versus  $1.00 \pm 0.71$ ;  $P=0.032$ ; Figure 5g). By contrast, *in vivo* peak NIRF signal for the unpolymerized type I collagen targeted peptide probe was 3.9-fold greater than the control ( $3.96 \pm 1.07$  versus  $1.00 \pm 0.03$ ;  $P=0.036$ ; Figure 5h) and *ex vivo* peak NIRF signal was 2.3-fold greater than the control but not statistically significant ( $2.31 \pm 1.30$  versus  $1.00 \pm 0.74$ ;  $P=0.286$ ; Figure 5h).

### **Colocalization of microscopic NIRF signal of ICAM-1 with endothelial cells localized in rabbit atheroma plaques.**

Immunostaining analysis was performed to further validate colocalization of NIRF signal of ICAM-1 on endothelial cells in atheroma plaques following local infusion of anti-ICAM-1 sdAbs imaging tracer. Figure 6 shows strong NIRF signal with confocal microscopy in the balloon-induced injured area of aortas following anti-ICAM-1 sdAbs colocalization with mouse anti-rabbit ICAM-1 monoclonal antibody (red NIRF signal), and subsequent incubation with goat anti-mouse IgG1 cross-absorbed secondary antibody (merge image, yellow NIRF signal).

## DISCUSSION

In the present study, we demonstrated the feasibility of local delivery of relatively small quantities of NIRF targeted tracers for *in vivo* imaging of both morphological and biological biomarkers of atherosclerotic plaques using a fully-integrated real-time intravascular bimodal IVUS-NIRF imaging catheter. This preliminary study describes an application using *in vivo* molecular agents for invasive imaging of both inflammation and atheroma plaque components that could be translatable for future detection of high-risk human coronary artery plaques.

*In vivo* NIRF catheter signal detection was obtained following *in situ* delivery of molecular agents targeting either ICAM-1 or unpolymerized type-I collagen in the balloon-induced injured area of the distal abdominal aorta of rabbits, as well as upstream of the injected region with the collagen-binding peptide agent. *In vivo* NIRF signals colocalized with atherosclerotic plaques visualized by IVUS, and signal intensity correlated with plaque burden. The use of a microporous-balloon catheter for *in situ* fluorescent probe injection, as well as repeated *in vivo* IVUS-NIRF imaging pullbacks in a single animal, demonstrated the feasibility and safety of the technique and enabled determination of NIRF molecular imaging probe kinetics for optimal *in vivo* catheter-based imaging. The use of a low-pressure microporous balloon-catheter system confers the advantage of both bringing imaging probes in contact with the intima, while avoiding plaque disruption or vessel trauma from its semi-compliant properties that eluded balloon over-expansion. Moreover, performing proper balloon sizing to vessel diameter by QCA prior to local infusion renders this technique suitable for translational applications in future studies. The absence of *in vivo* NIRF signal at the vicinity of atheroma plaques following injection of specific negative controls further validated the specificity of fluorescence signal obtained with both ICAM-1 and unpolymerized type-I collagen targeted imaging tracers. These findings were then confirmed by matching the whole rabbit aorta fluorescence reflectance imaging *ex vivo* with *in vivo* NIRF signal detected by intravascular NIRF, which showed signal colocalization in all rabbits with respect to both molecular imaging agents.

*In vivo* imaging tracer kinetic were analysed following multiple pullbacks performed at different time points using a custom dual-imaging catheter. Differences observed between *in vivo*

clearance kinetics of molecular tracers and their controls could be the result of both tracer's initial local diffusion of bounded probes on plaque surface, along with systemic clearance of unbound probes, leading to an initial decrease in signal intensity. A subsequent increase in fluorescence signal observed with both target-specific tracers in the aftermath of additional binding of the probes from systemic circulation/redistribution was seen, more predominantly with anti-ICAM-1 Abs, reaching a state of stability between 40 to 50 minutes. It is plausible that the peptide collagen probe diffused more easily in the plaque than ICAM-1 nanobodies immediately following local delivery and thus a faster saturation of the ligands was observed. Moreover, from the *ex vivo* imaging of the whole rabbit aortas, we've observed focal and diffuse NIRF signal from non-injured lipid-rich arterial segments, mostly in the thoracic aorta, which may explain less redistribution of the peptide probe at sites of the injured lipid plaques in subsequent imaging time points. Nevertheless, pharmaco-kinetic properties of both imaging tracers enable targeting diseased arterial segments prior to achieving a steady state, which makes them valuable for future studies in atherosclerosis imaging.

Numerous fluorophore-coupled imaging probes targeting a variety of molecular biomarkers have been previously tested in atherosclerotic animal models for intravascular imaging, including matrix metalloproteinases [25, 26], macrophages [23, 26], cathepsins [14-16, 26-28] and oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) [29]. Systemic administration of a prespecified dosage of these imaging compounds several hours prior to *in vivo* and/or *ex vivo* imaging was performed to allow fluorescent probe diffusion in the atheroma plaques. Indocyanine green was also used as a fluorescent probe in experimental animal models (10 mg/kg in rabbits) and humans (0.25-2 mg/kg) for the assessment of high-risk plaques following intravenous injection of safe doses [17, 18, 22, 23]. By contrast, our study demonstrated the feasibility and reliability of specific *in vivo* NIRF signals following local delivery of a concentration 6-50 times less than the intravenous dosage of molecular fluorescent tracers (0.04-0.4 mg/kg), with the advantages of avoiding potential risk of adverse effects or immune reactions from systemic administration, suboptimal biodistribution and tracer diffusion in regions of interest. As shown in atherosclerotic rabbits following local injection of the collagen-peptide probe, *in vivo* NIRF signals were observed not only in the balloon-induced injury area but also in several lipid-rich

regions of the aorta. This suggests that the use of another vector for selective *in vivo* probe delivery for future studies in coronary arteries could enable accurate imaging of biological biomarkers of surrounding atheroma plaques while avoiding the relative risk of vascular injury or compromising blood flow from *in situ* tracer delivery. The injection through a 6 F guiding catheter could be a plausible alternative however would enable a semi-selective injection of tracers rather than a local selective infusion in the region of interest. Perhaps the use of a microcatheter or thrombectomy catheter available in the catheterization laboratory would convey the injection of imaging probes at the vicinity of the plaque, thus render a more selective injection without the risk of ischemia or plaque disruption. From a translational standpoint, this technical application could certainly outweigh the limitations of conventional angiography in ascertaining the true extent of disease in the arterial wall, and for better assessment of non-flow limiting coronary stenoses harboring features of plaque instability.

A postmortem study revealed that plaque rupture was by far the most frequent cause of atherothrombosis, accounting for two-thirds of sudden cardiac deaths and more than 65% of acute myocardial infarctions [30]. Rupture-prone plaques are defined by a large lipid-rich necrotic core with an overlying thin fibrous cap infiltrated with macrophages and lymphocytes. The vulnerable plaque, or so-called thin-cap fibroatheroma (TCFA), is subjected to factors that can alter plaque morphology and thus lead to plaque instability and rupture [30, 31]. Although the PROSPECT (Providing Regional Observations to Study Predictors of Events in the Coronary Tree) study identified specific morphologic predictors of lesion progression in non-culprit plaques at 3 years assessed by virtual histology (VH-IVUS) [5], findings that were further supported by the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) and ATHEROREMO-IVUS (European Collaborative Project of Inflammation and Vascular Wall Remodeling in Atherosclerosis-Intravascular ultrasound) studies [6, 8], plaque morphology and composition alone do not accurately predict which non-culprit plaques will cause recurrent adverse cardiac events. Thus, routine use of invasive imaging to screen for vulnerable plaques and to predict the risk of cardiovascular complications is currently proscribed [32]. This reinforces the potential of imaging active biological processes to provide new insights on atheroma plaque growth, healing and biomarkers involved in plaque instability. In the present study, ICAM-1 and

unpolymerized type-I collagen were the selected biomarkers for *in vivo* molecular imaging of both inflammation and plaque morphology. With the knowledge that ICAM-1 is involved in plaque formation and progression, while collagen, a major constituent of atheroma plaque, undergoes proteolysis and is less produced by smooth muscle cells (SMC) in high-risk plaques, the quantification of both biomarkers by NIRF-IVUS could enable characterization of plaque morphology and harbor the potential to discriminate between stable and unstable plaques at risk of rupture, along with other inflammatory biomarkers. We have demonstrated that dual injection of molecular probes coupled with tracers harboring different excitation and emission wavelength properties enabled accurate NIRF signal discrepancy in a single animal. Perhaps the combination of several biological fluorescent agents, along with plaque morphology assessed by catheter-based technology (IVUS or OCT), may be an attractive avenue for identifying *in vivo* high-risk plaques in future studies.

The current study describes a reliable technique for imaging specific features of atherosclerotic plaques using local delivery of labeled specific molecular tracers followed by intravascular IVUS-NIRF imaging. Although this proof-of-principle study using novel molecular imaging probes is promising for identifying both structural and biological properties of atherosclerotic plaques, these preliminary findings should be validated in a longitudinal study using a larger animal model that features coronary atheroma with a phenotype more similar to that observed in humans (e.g. swine). Such studies may provide new insights on plaque inflammation at early stages of the disease. Given that both ICAM-1 and unpolymerized type-I collagen have not yet been established as being indicative of plaque rupture and thrombotic complications, the application of this imaging methodology using a combination of newly designed tracers targeting these biomarkers could pave the way for a better understanding of the pathophysiology of high-risk atheroma plaques and disease progression, especially the contributions of plaque inflammation and tissue (collagen) remodeling, and may allow to develop future targeted therapies (personalized medicine).

## LIMITATIONS

Notwithstanding that this study demonstrates the feasibility of *in vivo* labeled tracer-based IVUS-NIRF intravascular molecular imaging as a method for detection of inflamed atherosclerotic plaques, there are several limitations to be mentioned. First, we were unable to conduct correlation analysis of quantified NIRF signal between *in vivo* and *ex vivo* fluorescence signal detected in rabbit aortas due to the small sample size. Second, despite *in vivo* and *ex vivo* blood clearance kinetics analyses of both molecular agents for optimal timing of *in vivo* catheter-based imaging, their diffusion properties from plaque surface remain unknown. Since a single concentration of all tracers was tested in the present study, it remains to be determined whether a lower dose using the same administration method would provide sufficient NIRF enhancement for *in vivo* catheter-based signal detection. In addition, *in vivo* imaging was performed at different time-points over a 40-minute period and, from the late resurgence in signal intensity detected by the imaging catheter *in vivo* for both probes, the optimal timing for intravascular imaging may be beyond this timeline. *In vivo* NIRF signal was obtained with 2 collagen negative control probes in lipid-rich regions of the aorta, which probably was a result of nonspecific binding of the tracer to plaque surface which may bear an endothelial surface more permeable than non-diseased regions. Another limitation is the large diameter of the current bimodal IVUS-NIRF imaging catheter prototype due to the rigid optic fiber, which limited catheter-to-wall distance in rather small diameter distal abdominal aortas. Nevertheless, further optimization of catheter dimensions and flexibility, in addition to the validation of this novel imaging technique in a porcine atherosclerotic model with plaque biology more similar to human fibroatheroma plaques, will be required to overcome these limitations.

## **METHODS**

### **Animal model and experimental protocol**

The atherosclerotic plaque model was generated by performing balloon denudation in the distal abdominal aorta of 15 male New Zealand White rabbits (3 kg, aged 12-13 weeks; Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) at week 0. Rabbits were then placed on a cholesterol-enriched diet (0.5% cholesterol, Harlan Teklad Diets, Madison, WI) for 12 consecutive weeks (Fig. 1). The experimental protocol was approved by the animal ethics committee of the Montreal Heart Institute Research Center according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### **Balloon denudation**

Under continuous anesthesia (acepromazine (1 mg/kg intramuscular (IM)), buprenorphine (0.01 mg/kg IM) and inhaled isoflurane (4% v/v, Baxter, Deerfield, IL)), a 5 French (F) sheath catheter (Cordis Corporation, Miami, FL, USAs) was used to cannulate the right carotid artery. Baseline angiography of the abdominal aorta (Siemens, Germany) was performed using a 5 F right Judkins (JR) 4.0 guiding catheter (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) inserted into the aorta over a 0.014-inch guidewire (Abbott Vascular, Santa Clara, CA). The minimal lumen diameter (MLD) of the abdominal aorta, measured on an end-diastolic frame by quantitative coronary analysis (QCA; Syngo software, ARTIS Siemens, Germany), was used for accurate PTCA balloon sizing. Under fluoroscopic guidance, balloon injury was performed in the distal 40-mm of the abdominal aorta using a standard PTCA balloon-catheter (Boston Scientific, Marlborough, MA), corresponding to a balloon/artery ratio of 1.1 to 1.2:1, that was inflated at 10 atm for 30 seconds over three consecutive times, with 30-second intervals between inflations. After balloon denudation, the sheath catheter was removed, and the right carotid artery was ligated. Post-operative care consisted in strict monitoring of the vital signs and animal behavior. Analgesia was managed by subcutaneous administration of buprenorphine (0.02 mg/kg) and ketoprofen (2 mg/kg) immediately after the procedure and on day 1 (2 doses). Post-operative infection management consisted in a prophylactic dose of Borgal (67 mg/kg) administered

subcutaneously immediately after the surgery combined to a sterile dressing applied on the surgical wound, with daily surveillance of the surgical sutures.

### **Anti-ICAM-1 single-domain antibody**

Anti-ICAM-1 V<sub>H</sub>H single-domain antibody (sdAb) or nanobodies were generated by immunizing a male lama. A V<sub>H</sub>H library was constructed and panned as described before [29]. After four rounds of panning against recombinant human ICAM1 (R&D systems), ICAM-specific V<sub>H</sub>H were identified by phage-ELISA. Unique V<sub>H</sub>H sequences, identified by sequencing, were sub-cloned into pSJF2 expression vector and the V<sub>H</sub>Hs were expressed in TG1 bacteria as described before (US patent: 8,623,369 B2) [29]. The ICAM-1 sdAbs were purified by IMAC column and size-exclusion chromatography (SEC), and their binding affinities were determined by surface plasmon resonance (SPR) [29]. The SEC-purified sdAbs were labeled with IRDye<sup>®</sup> 800CW (LI-COR Biosciences, MA, USA) infrared dye for NIRF imaging. An ELISA was used to confirm functional reactivity of ICAM-1 sdAb before and after labeling. Briefly, wells of a Nunc96 plate were coated with the recombinant human ICAM and blocked with Strating Block (Thermo Scientific). Serial dilution of sdAbs were added to the wells and incubated for 1 hour at room temperature. Specific bindings of sdAbs were detected by rabbit anti-His tags-HRP conjugate (Bethyl lab), the color was developed by adding KPL substrate (KPLGaithersburg, MD) and the plate was read at 450 nm [33]. As controls, wells with no antigen (blank) and coated by ICAM-1 but used a nonrelated V<sub>H</sub>H were included in the assay.

### **Collagen-binding linear hairpin (CBLH) peptide**

This probe was derived from a collagen-binding hairpin peptide GEWTWDDATKTWTWTE that targets specifically unpolymerized type I collagen (US patent publication: 2016/0168210 A1). The peptide portion of this probe GEWTWDDATKTWTWTEGGC was purified using HPLC from materials obtained by solid-phase peptide synthesis (SPPS) and labeled via the Cys residue with Alexa-660-monomaleimide (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) infrared dye for NIRF imaging. A negative control peptide ETVTFTKTADDYTSEGGGC was derived from a non-binding peptide GEWTYDDATKTFTVTE (US patent publication: 2016/0168210 A1)

with the Trp (W) residue replaced by Ser followed by sequence reversal. The control peptide was also conjugated to Alexa-660-monomaleimide. Both probes were further purified using HPLC after Alexa-660 conjugation and dried to powders before reconstitution in physiological saline. Final concentrations of the peptide probes were determined by use of the dry weight of the peptide powders.

### **Rabbit atherosclerotic aorta sections**

Cryosections from rabbit atherosclerotic aortas were used to test the reactivity of both the anti-ICAM-1 sdAb and unpolymerized type I collagen peptide probes, with their respective negative controls, by *ex vivo* fluorescence microscopy. Cryostat sections of 8  $\mu\text{m}$  were obtained and incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of either probe for 2 hours at room temperature. Images were taken at 20x with a confocal microscope Zeiss LSM 7 Duo (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany) with filter sets for Alexa-660 and IR800CW fluorescence signal detection (excitation/emission, 633/641-759 nm).

### ***In vivo* intravascular ultrasound (IVUS) – near-infrared fluorescence (NIRF) imaging catheter system**

The 5 F compatible custom-made imaging catheter used in this study has been previously described [34, 35]. The catheter combines a 400  $\mu\text{m}$  optical fiber that enables 360-degree fluorescence imaging and photoacoustic excitation, and an ultrasound transducer (extracted from the commercially available IVUS 45 MHz Revolution catheter; Volcano Therapeutics, Rancho Cordova, CA) for acoustic imaging and photoacoustic signal detection. The catheter has a diameter of 1.4 mm and is connected to an electronic circuit that enables synchronized acquisitions of fluorescence and IVUS imaging modalities from rotating pullbacks at an angular speed of 30 revolutions/second. The pullback speed was set to 0.5 mm/second and the frame rate was 10 images/seconds, with a total pullback length of 100 mm. Raw data is transferred to a computer bearing a custom Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA) user interface that filters the signals, reconstructs, and displays the images in real time during acquisition. This

single NIRF-IVUS system enable to interchange lasers and filters according to the fluorophore properties to be imaged. Fluorescence excitation was performed using either a 730-nm laser diode for IR800CW labeled probe or a 660-nm laser diode for Alexa-660 labeled probe. We've measured Alexa-660 with the 800-nm channel and IR800CW with the 660-nm channel with the imaging catheter and no bleed-through was detected. Emission was detected by a photomultiplier tube (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) combined to either a 776-nm longpass filter (IR800CW) or a  $716 \pm 20$  nm filter (Alexa-660).

### ***In vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) imaging procedure**

Of the 15 animals, two died after balloon denudation and were excluded; 13 animals were used to perform *in vivo* imaging procedures at week 12. Under general anesthesia, a 5 F sheath catheter (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) was used to cannulate the left carotid artery. Under fluoroscopic guidance, molecular probes were injected at the injured site of the distal abdominal aorta upstream from the aorto-iliac bifurcation using a 20-mm-long semi-compliant microporous balloon catheter (ClearWay™ RX, Atrium Medical, New Hampshire, USA) [36] inserted over a 0.014-inch guidewire (Abbott Vascular, Santa Clara, CA). Administration dosage for the collagen-targeting probe was 0.07-0.12 mg per rabbit (formulated in an infusion volume of 2.5 mL), which was set according to the probe dosage of 0.25-0.5 mg/kg/probe in rat or mouse systemic biodistribution studies (US patent publication: 2016/0168210 A1). The anti-ICAM-1 sdAb dosage was 0.4 mg/kg per rabbit. Accurate porous-balloon catheter sizing (balloon/artery ratio of 1.1 to 1.2:1) was determined by the minimal lumen diameter (MLD) of the abdominal aorta measured on an end-diastolic frame by quantitative coronary analysis (QCA; Syngo software, ARTIS Siemens, Germany). The infusion was done over 90-sec, at 4 atm, followed by a flush of saline (1.5 mL). Seven rabbits had a single injection of either the probe targeting ICAM-1, unpolymerized type-I collagen, or their respective negative controls at the injury site of the distal abdominal aorta; six rabbits had a dual-probe injection of either the combined molecular tracers or the combined controls. Immediately after the injection, the intravascular imaging catheter was inserted over a 0.014-inch guidewire and *in vivo* IVUS-NIRF imaging of the distal abdominal aorta was acquired every 10 minutes over a 40-minute period. For dual-probe injection, 2 consecutive pullbacks were performed at every time-points with

different bandpass optical filters for fluorescence detection of both tracers. A total of 5 serial pullbacks were performed in the same arterial segment for each rabbit, whereas the aorto-iliac bifurcation corresponds to the proximal anatomic landmark of the 50-mm length pullback. Blood samples were taken from the sheath catheter (1 mL) prior to each pullback to perform *ex vivo* fluorescence imaging. At the end of the experiment, animals were sacrificed and the aorta was resected.

### ***In vivo* intravascular ultrasound (IVUS) – near-infrared fluorescence (NIRF) image analysis**

A dedicated blood attenuation algorithm was applied to all *in vivo* pullbacks, as previously described [35], to compensate the fluorescence signal amplitude with the distance between the imaging catheter and the arterial wall.

### ***Ex vivo* fluorescence imaging and histopathology**

After euthanasia and saline infusion, aortas were resected, opened and manually elongated in a petri dish coated with black wax and filled with saline to perform *en face* FRI at 37°C using a commercial epi-illumination fluorescence imaging system (IVIS Lumina II, PerkinElmer, MA, USA). The following parameters were used: Ex/Em 745 ± 20 / 800 nm ± 20 nm for anti-ICAM-1 sdAbs and 640 ± 20 / 720 ± 20 nm for collagen-binding peptide probe, a field of view (FOV) of 10 cm, F/stop 1, Binning (M) 4/2, excitation time of 20 seconds. The total fluorescence values (intensity/cm<sup>2</sup>) of the region of interest (i.e. 20-mm injected area in the distal abdominal aorta) were analysed using a computer-based digitizing image system software (Lumina II Living Image 2.0). After each imaging session, the regions of interest (ROI; 15 mm in length) were embedded in Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and preserved at -80°C for further microscopy validation of the *ex vivo* imaging results. The average tissue shrinkage was estimated between 25-30%, according to side branches that were used as landmarks and pullback length. For histopathology analyses, several 6-µm sections were cut, and morphometry was demonstrated with Masson's trichrome staining, including collagen and fibrosis

quantification. Von Kossa staining was performed to identify calcium in the neointima and media, and Oil red O (ORO, Sigma) to identify neutral lipids in the neointima and media.

### **Immunohistochemical staining**

Cryosections (10  $\mu\text{m}$  thickness) were obtained from fresh-frozen rabbit aortas. Fluorescence microscopy of aorta sections comprised in the region of interest was performed using a Zeiss LSM 7 Duo microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany) that visualized the distribution of anti-ICAM-1 NIRF signal (Ex/Em, 638/755 nm) and anti-ICAM-1 antibody (Ex/Em, 544/649 nm). NIRF signal colocalization was performed using a mouse anti-rabbit ICAM-1 monoclonal antibody, clone Rb2/3 (kindly provided by Pr. Miron Cybulsky, University of Toronto, Canada). Slides were fixed for 5 minutes in acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$  and incubated overnight with primary antibody at  $4^{\circ}\text{C}$ , followed by staining with a goat anti-mouse IgG1 cross-absorbed secondary antibody, Alexa Fluor 555 (A-21127, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean $\pm$ SEM (standard error of the mean). Mann-Whitney test was used to compare peak plaque TBR between the molecular probe injection group and the control injection group for both *in vivo* and *ex vivo* fluorescence studies using Prism 7.0 (GraphPad Software, Sand Diego, CA). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### **Data availability statement**

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

### **Acknowledgements**

The authors thank Vanessa Durocher-Granger, Isabelle Croteau, Natasha Duquette, Marc-Antoine Gillis, Robert Clément, Karine Nadeau and André-François Couture D.M.V. for their participation in animal preparation and care. Feng Ni thanks the expert assistance of The-Minh Tu, Ping Wang and Ping Xu for the purification and characterization of collagen probes. We also thank Marie-Elaine Clavet for her assistance in histopathology analysis.

### **Author contributions statements**

M-J.B. wrote the manuscript. M-J.B., P.L.L., E.R., F.L. and J-C.T. designed the experiments. M-J.B., M.A., F.M., P.G., T.A-M., N.M., D.B. and P-L.T. conducted the experiments. M.A. and F.L. previously developed the multimodal imaging system and catheter. F.N. designed and synthesized the unpolymerized type-I collagen peptide probes. A.A. and M.A-G. designed and synthesized the anti-ICAM-1 antibody. N.M., D.B., T.A-M. and P.G. participated in the development of the animal model protocol and experiments. M.S.'s laboratory conducted the histopathology analysis. All authors reviewed the manuscript.

### **Competing interest statements**

M-J.B., M.A., F.M., P-L.T., N.M., D.B., P.G., T.A-M., A.A., M.A-G., M.S., P.L.L., E.R., F.L. and J-C.T. have no financial and non-financial competing interests to declare.

### **Funding**

This research was supported by the University of Montreal Endowed Research Chair in atherosclerosis and the Canada Research Chair in translational and personalized medicine to Dr Jean-Claude Tardif, a NSERC CRC Chair in Optical Vascular Imaging and CIHR grant to F. Lesage (273578). Feng Ni and Abedelnasser Abulrob were supported by the Biologics and Biomanufacturing Program of the National Research Council of Canada (NRCC Publication No. 53369).

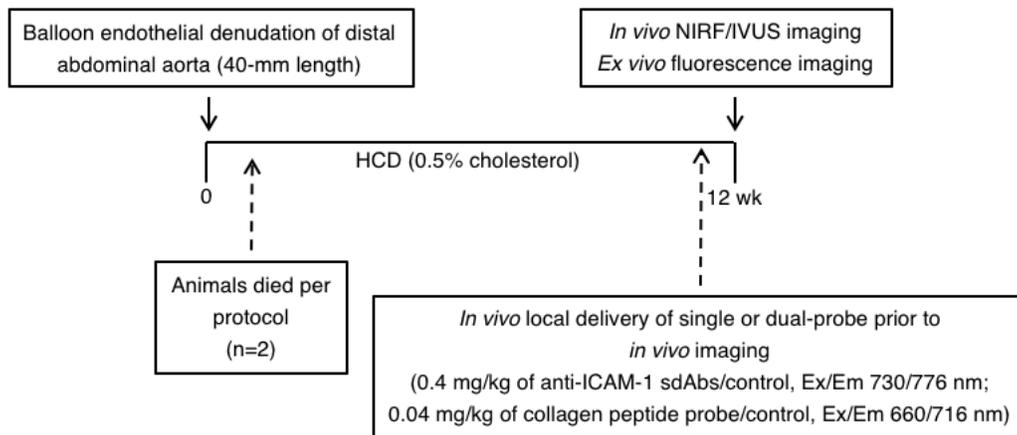
## REFERENCES

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics – 2015 update: a report from the American heart association. *Circulation* 131, e29–322 (2015).
2. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I and part II. *Circulation* 108, 1664-1672 (2003).
3. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126 (1999).
4. Puri R, Niholls SJ, Ellis SG, et al. High-risk coronary atheroma. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 1134-1140 (2014).
5. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, et al. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 364, 226-235 (2011).
6. Calvert PA, Obaid DR, O’Sullivan M, et al. Association between virtual histology intravascular ultrasound findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) study. *J. Am. Coll. Cardiol. Imaging* 4, 894-901 (2011).
7. Stone PH, Saito S, Takahashi S, et al. Prediction of progression of coronary artery disease and clinical outcomes using vascular profiling of endothelial shear stress and arterial plaque characteristics: the PREDICTION study. *Circulation* 126, 172-181 (2012).
8. Cheng JM, Garcia-Garcia HM, de Boer SP, et al. In vivo detection of high-risk coronary plaques by radiofrequency intravascular ultrasound and cardiovascular outcome: results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Eur. Heart J.* 35, 639-647 (2014).
9. Jaffer FA, Verjans JW. Molecular imaging of atherosclerosis: clinical state-of-the-art. *Heart* 100, 1469-1477 (2014).
10. Kim JW, Jaffer FA. Emerging molecular targets for intravascular imaging of high-risk plaques. *Curr. Cardiovasc. Imaging Rep.* 3, 237-247 (2010).
11. Calfon MA, Vinegoni C, Ntziachristos V, Jaffer FA. Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques. *J. Biomed. Opt.* 15, 011107 (2010).

12. Lanza GM, Wallace KD, Scott MJ, et al. A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation* 94, 3334-3340 (1996).
13. Flacke S, Fischer S, Scot MJ, et al. Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation* 104, 1280-1285 (2001).
14. Jaffer FA, Vinegoni C, John MC, et al. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation* 118, 1802-1809 (2008).
15. Jaffer FA, Calfon MA, Rosenthal A, et al. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 2516-2526 (2011).
16. Yoo H, Kim JW, Shishkov M, et al. Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo. *Nat. Med.* 17, 1680-1685 (2011).
17. Lee S, Lee MW, Cho HS, et al. Fully integrated high-speed intravascular optical coherence tomography/near-infrared fluorescence structural/molecular imaging in vivo using a clinically available near-infrared fluorescence-emitting indocyanine green to detect inflamed lipid-rich atheromata in coronary-sized vessels. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 7, 560-569 (2014).
18. Kim S, Lee MW, Kim TS, et al. Intracoronary dual-modal optical coherence tomography-near-infrared fluorescence structural-molecular imaging with a clinical dose of indocyanine green for the assessment of high-risk plaques and stent-associated inflammation in a beating coronary artery. *Eur. Heart J.* 37, 2833-2844 (2016).
19. Bozhko D, Osborn EA, Rosenthal A, et al. Quantitative intravascular biological fluorescence-ultrasound imaging of coronary and peripheral arteries in vivo. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* 18, 1253-1261 (2017).
20. Li Y, Jing J, Qu Y, et al. Fully integrated optical coherence tomography, ultrasound, and indocyanine green-based fluorescence tri-modality system for intravascular imaging. *Biomed Opt. Express* 8, 1036-1044 (2017).
21. Nutt R, Vento LJ, Ridinger MH. In vivo molecular imaging biomarkers: clinical pharmacology's new "PET"? *Clin. Pharmacol. Ther.* 81; 792-795 (2007).

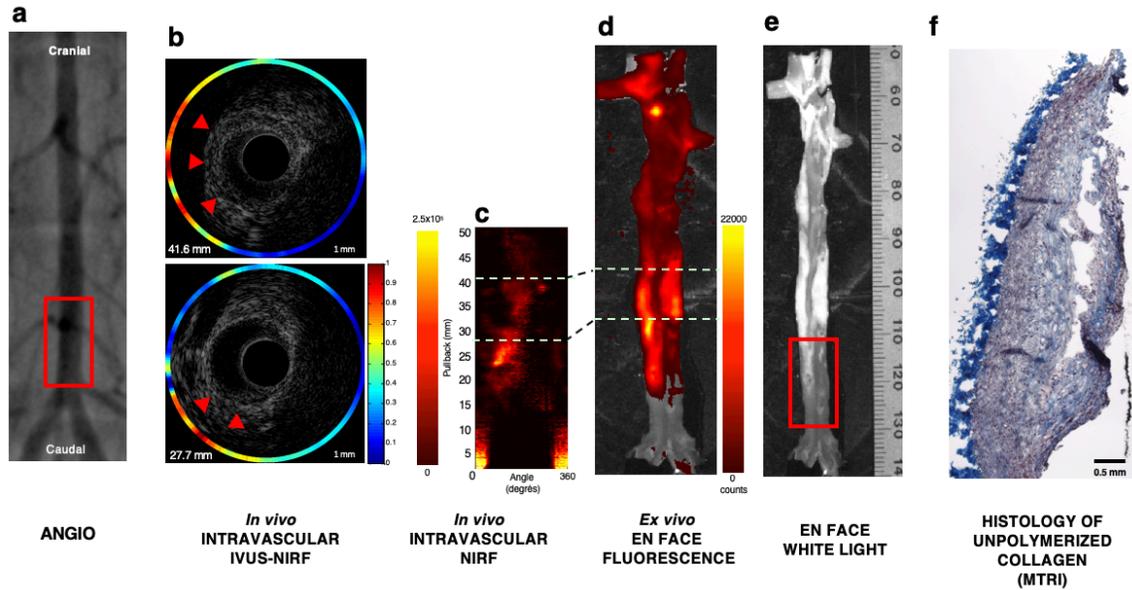
22. Verjans JW, Osborn EA, Ughi GJ, et al. Targeted near-infrared fluorescence imaging of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol. Imaging* 9; 1087-1095 (2016).
23. Vinegoni C, Botnaru I, Aikawa E, et al. Indocyanine green enables near-infrared fluorescence imaging of lipid-rich, inflamed atherosclerotic plaques. *Sci. Transl. Med.* 3; 84ra45 (2011).
24. Tardif PL, Bertrand MJ, Abran M, et al. Validating intravascular imaging with serial optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 17, E2110 (2016).
25. Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, et al. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation* 114; 55-62 (2006).
26. Quillard T, Croce K, Jaffer FA, et al. Molecular imaging of macrophage protease activity in cardiovascular inflammation in vivo. *Thromb. Haemost.* 105; 828-836 (2011).
27. Chen C, Tung CH, Mahmood U, et al. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* 105; 2766-2771 (2002).
28. Jaffer FA, Kim DE, Quinti L, et al. Optimal visualization of cathepsin K activity in atherosclerosis with a novel, protease-activable fluorescence sensor. *Circulation* 115; 2292-2298 (2007).
29. Khamis RY, Woollard KJ, Hyde GD, et al. Near infrared fluorescence (NIRF) molecular imaging of oxidized LDL with an autoantibody in experimental atherosclerosis. *Sci Rep* 6: 21785 (2016).
30. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20; 1262-1275 (2000).
31. Muller JE, Tofler GH, Stone PH. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation.* 79; 733-743 (1989).
32. Mintz GS. Clinical utility of intravascular imaging and physiology in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64; 207-222 (2014).
33. Baral TN, MacKenzie R, Arbabi Ghahroudi M. Single-domain antibodies and their utilities. *Curr Protoc Immunol.* 103; Unit 2.17 (2013).

34. Abran M, Cloutier G, Roy Cardial Marie-Hélène, et al. Development of a photoacoustic, ultrasound and fluorescence imaging catheter for the study of atherosclerotic plaque. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* 8, 696-703 (2014).
35. Abran M, Stähli BE, Merlet N, et al. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits. *Biomed. Opt. Express* 6, 3989-3999 (2015).
36. Saraf S, Ong PJJ, Gorog DA. ClearWay™ RX – Rapid exchange therapeutic perfusion catheter. *Eurointervention* 3, 639-642 (2008).



**Figure 1. Atherosclerotic rabbit model.**

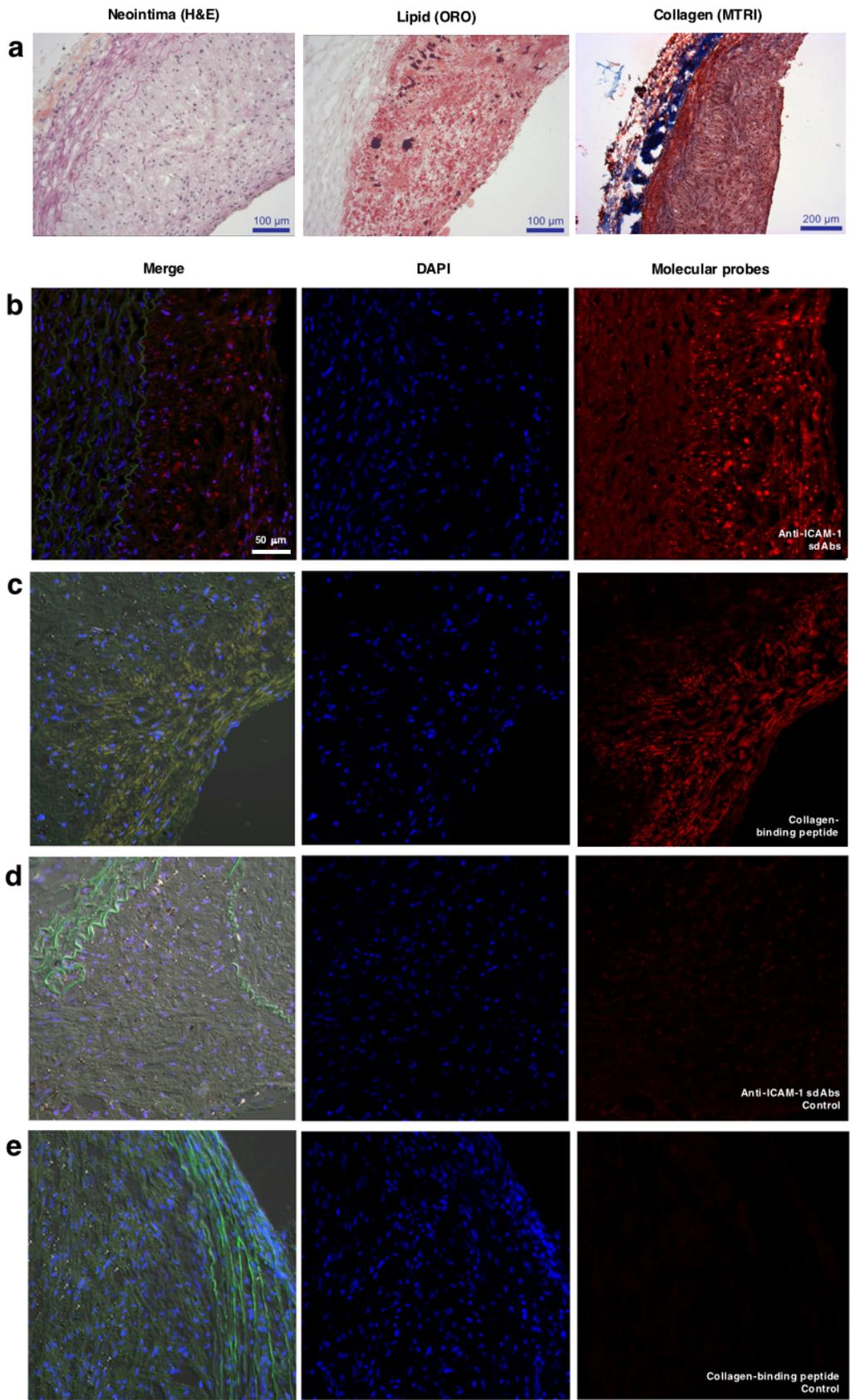
At week 0, 15 male NZW rabbits of 12-13 weeks of age underwent balloon denudation of the distal abdominal aorta (40-mm length), upstream of the aorto-iliac bifurcation. At recovery, they were fed with a high-cholesterol diet (HCD) (0.5% cholesterol) over a period of 12 weeks. *In vivo* imaging experiments were performed at week 12, which consisted in performing local delivery of labeled NIRF molecular probes (0.04-0.46 mg/kg/probe) using a porous-balloon catheter at the site of the injured aorta. Immediately after local probe infusion, *in vivo* IVUS-NIRF imaging was acquired and repeated every 10-min for 40 minutes (total of 5 pullbacks/rabbit). Following *in vivo* imaging, *ex vivo* fluorescence imaging and histopathology were performed.



**Figure 2. NIRF molecular imaging of unpolymerized type-I collagen in atherosclerotic balloon injured rabbit abdominal aortas.**

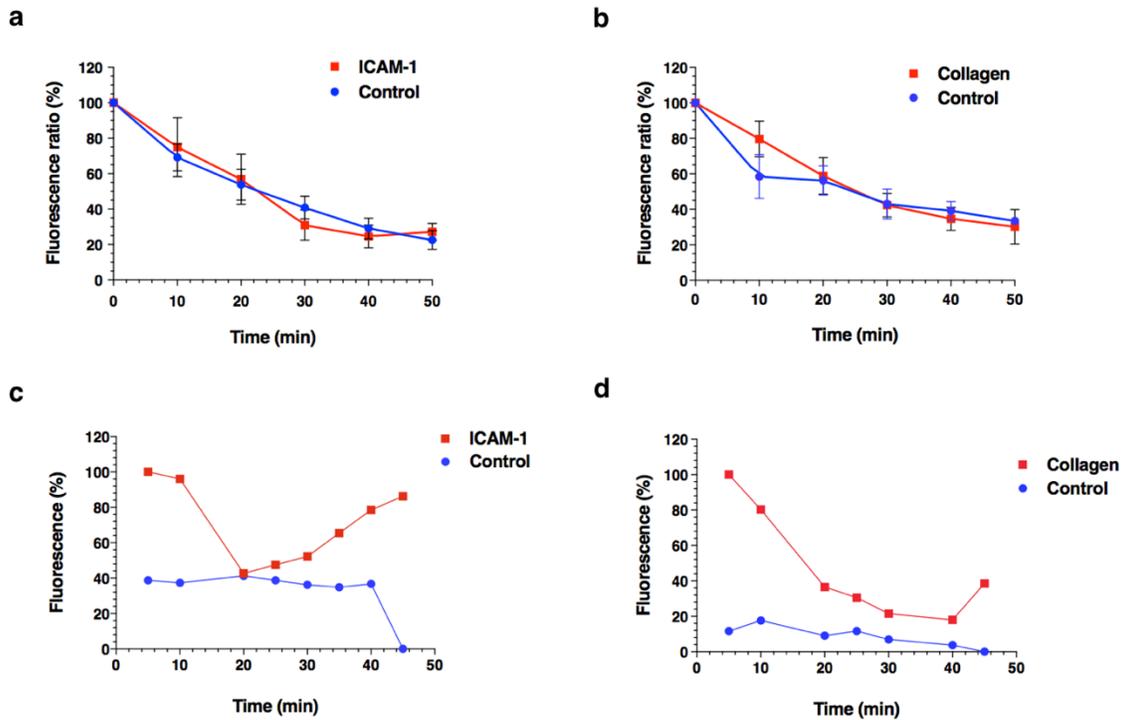
Collagen-binding hairpin peptide was injected locally (0.04 mg/kg) in the balloon-injured distal abdominal aorta of atherosclerotic rabbits after 12 weeks of 0.5% cholesterol-enriched diet. **(a)** Shows conventional angiography of the rabbit aorta with the red box indicating the balloon-injured area; **(b)** Represents IVUS imaging cross-sections of the aorta at two distinct pullback distances from the aorto-iliac bifurcation (27.7 mm and 41.6 mm, respectively). Red arrows delineate eccentric atherosclerotic plaques on IVUS imaging, which are colocalized with higher NIRF signal intensity (orange/red, outer color spectrum); **(c)** Shows *in vivo* intravascular NIRF imaging pullback of collagen-binding peptide probe localization in the rabbit abdominal aorta performed 40 minutes after local injection of the NIRF labeled agent; **(d)** Demonstrates *ex vivo* *en face* fluorescence of collagen-binding peptide over the entire rabbit aorta performed 60 minutes after local injection of the NIRF labeled agent. There are two distinct zones of higher NIR-fluorescence signal intensity seen on either *in vivo* and *ex vivo* NIRF imaging, localized mostly upstream of the injection area (**c, d**); **(e)** Shows the corresponding white light image of the rabbit aorta with the red box indicating the balloon injured area. The distinct zones of higher NIRF signal displayed on both *in vivo* and *ex vivo* images appear to be localized in a lipid-rich plaque area (bright white areas); **(f)** Correlation histopathology of unpolymerized collagen in

the distal abdominal aorta following staining with Masson's trichrome (MTRI). *In vivo* NIRF color scale is in arbitrary units (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). *Ex vivo* NIRF color scale displays number of counts according to signal intensity (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity).



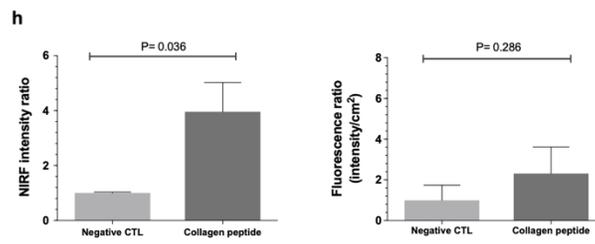
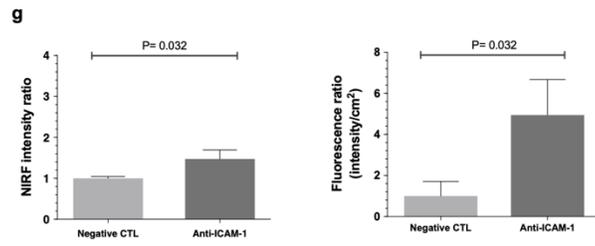
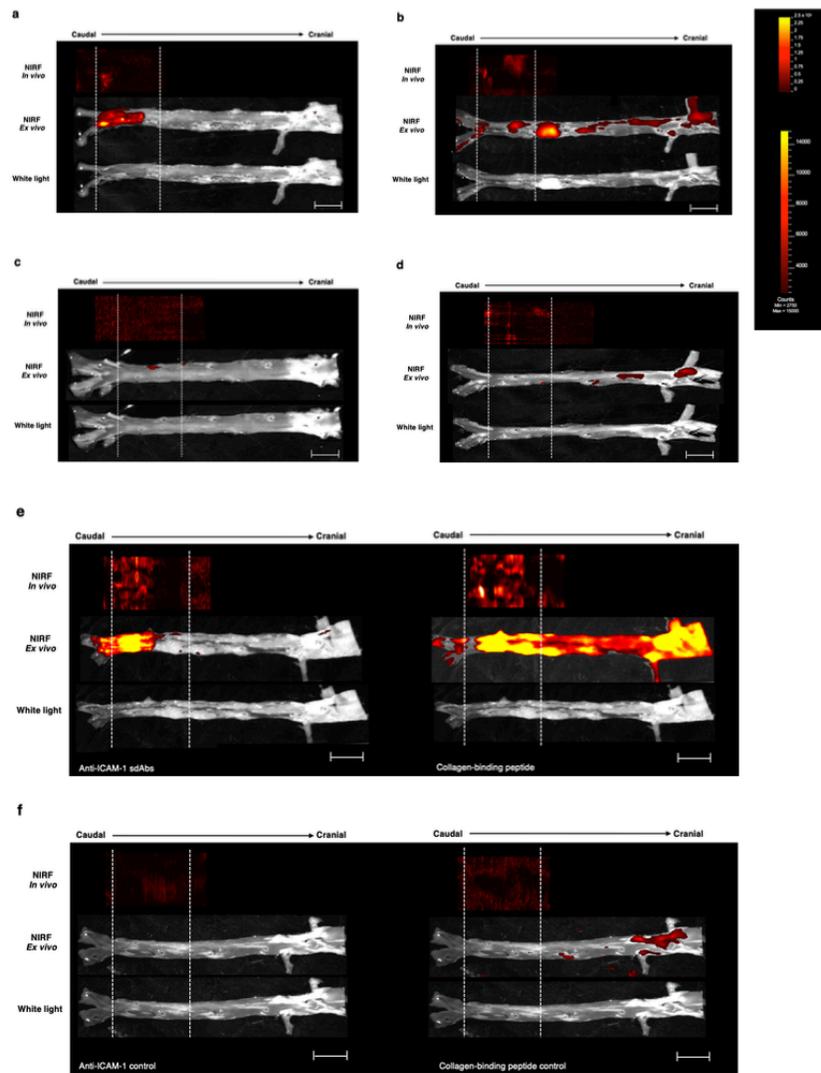
**Figure 3. *Ex vivo* binding of NIRF molecular probes targeting ICAM-1 and unpolymerized collagen type I to atherosclerotic lesions in rabbit aortas.**

Atherosclerotic rabbit model. **(a)** Shows histopathology staining of rabbit denudated aorta sections. Left panel represents neointima staining with hematoxylin and eosin (H&E); mid-panel represents neutral lipids staining with Oil red O (ORO); right panel represents collagen staining with Masson's trichrome (MTRI). All images are at x4 magnification. Cryosections from atherosclerotic rabbit aorta were stained with: **(b)** anti-ICAM-1 sdAbs; **(c)** collagen-binding peptide; **(d)** anti-ICAM-1 sdAbs control antibody and; **(e)** collagen-binding control peptide. The right panel shows fluorescence signal from either molecular probe targeting ICAM-1 or unpolymerized collagen type I, or the negative control probes. The left panel shows a merged image of both DAPI and the fluorescent molecular probes. The cell nuclei (blue) were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate).



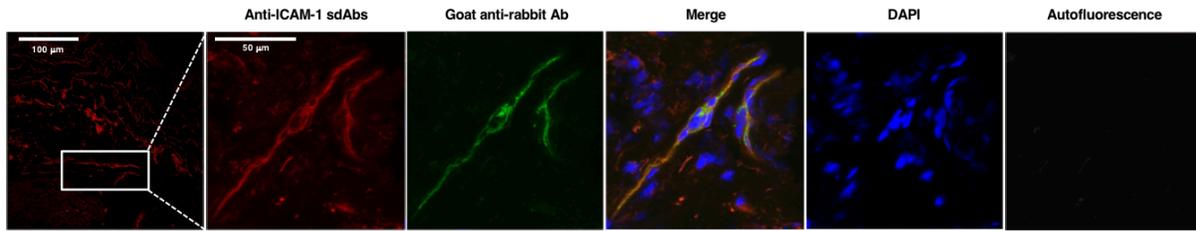
**Figure 4. Blood clearance of molecular probes in atherosclerotic rabbits.**

Clearance from the blood of: **(a)** anti-ICAM-1 sdAbs (red squares) and the corresponding negative control (blue circles) from (n= 5/group) and; **(b)** collagen-binding peptide (red squares) and the corresponding negative control (blue circles) (n=5 in the collagen group; n=4 in the control group). Blood clearance kinetics shows a continuous decrease in NIRF signal intensity, which tends to stabilize 40 minutes after *in vivo* local injection of all NIR-fluorescence molecular agents. *In vivo* fluorescence signal detected by IVUS-NIRF catheter of both **(c)** anti-ICAM-1 sdAbs (red squares) and **(d)** collagen-binding peptide, by comparison to their negative controls (blue circles). Both imaging probes shows an initial strong NIRF signal that decreases rapidly, followed by a re-increase in signal intensity between 20-40 minutes, mostly seen with anti-ICAM-1 sdAbs. By contrast, a weak fluorescence signal is observed for both negative controls following *in vivo* local injection in the injured zone, which then becomes undetectable after 45 minutes. Data points are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) from the rabbits combined.



**Figure 5. Comparison of *in vivo* and *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) imaging of targeted ICAM-1 and collagen in atherosclerotic rabbit aortas.**

Comparison of *in vivo* NIRF imaging and *ex vivo* fluorescence signal following single-probe local injection of either: (a) anti-ICAM-1 sdAbs, (b) collagen-binding peptide, (c) ICAM-1 negative controls; (d) collagen negative control; (e) dual-probe local injection of anti-ICAM-1 sdAbs combined to collagen-binding peptide probe, or (f) the combined negative controls. *In vivo* and *ex vivo* signals were colocalized in both single- and dual-probe injections along the longitudinal direction and delineated by white dot lines. *In vivo* and *ex vivo* fluorescence signals were properly aligned, taking into account post-mortem average tissue shrinkage estimated between 25-30%. In both groups, NIRF signal was only detected over the balloon-injured zone with the anti-ICAM-1 sdAbs agent (a, e). However, fluorescence signal was observed upstream from the injection zone with the collagen-binding peptide probe, notably in an aneurysm lipid-rich area of the aorta, as shown in (b, e). There were no NIRF signals detected in the control-injected groups (c, d, f), except in the abdominal and thoracic aorta of 2 rabbits following dual-injection of the control collagen-specific agent. *In vivo* and *ex vivo* peak NIRF signal in: (g) ICAM-1 probe- and (h) collagen-peptide probe injected abdominal aortas. White dot lines indicate the injury zone of the distal abdominal aorta, site of molecular probes delivery through the porous-balloon catheter. *In vivo* NIRF color scale is in arbitrary units (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). *Ex vivo* NIRF color scale displays number of counts according to signal intensity (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). Scale bar: 10 mm. Data is presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).



**Figure 6. Immunostaining validation of anti-ICAM-1 Abs in atherosclerotic rabbit aortas.** Colocalization of ICAM-1 in atherosclerotic rabbit aorta by immunofluorescence. Anti-ICAM-1 sdAbs NIRF signal colocalize with ICAM-1 on endothelial cells by staining the sections with primary mouse anti-rabbit ICAM-1 monoclonal antibody (red NIRF signal, images 1 and 2), followed by a secondary labeling using goat anti-mouse IgG1 antibody (green NIRF signal, image 3), The merged image shows specific colocalization of ICAM-1 on endothelial cell surface of atherosclerotic aorta segments (yellow NIRF signal, image 5). The endothelial cell nuclei (blue) were stained with DAPI (image 5). No autofluorescence signal was detected under confocal microscopy (image 6).

## 2. Étude #2

### **Dual intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence imaging (NIRF) of ICAM-1 for assessment of atheroma inflammation.**

Marie-Jeanne Bertrand, Foued Maafi, Maxime Abran, David Busseuil, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Pascale Geoffroy, Pier-Luc Tardif, Abedelnasser Abulrob, Mehdi Arbabi-Ghahroudi, Martin Sirois, Éric Rhéaume, Philippe L'Allier, Frédéric Lesage, Jean-Claude Tardif.

Manuscrit soumis à Circulation Cardiovascular Imaging.

#### Apport original et contribution des co-auteurs

La contribution du premier auteur, Marie-Jeanne Bertrand, est majoritaire puisqu'elle a réalisé toutes les expérimentations techniques relatives à l'étude et a entièrement rédigé le manuscrit. Dr Marie-Jeanne Bertrand, Dr Philippe L'allier, Dr Éric Rhéaume, Dr Frédéric Lesage et Dr Jean-Claude Tardif ont participé à l'élaboration des expérimentations. Dr Maxime Abran, Dr Philippe L'Allier, M. Foued Maafi, Dr Nolwenn Merlet, Mme Téodora Mihalache-Avram, Mme Pascale Geoffroy, Dr David Busseuil et M. Pier-Luc Tardif ont également réalisé les expérimentations par cathéter. Dr Mehdi Arbabi-Ghahroudi et Dr Abedelnasser Abulrob ont développé et synthétisé l'anticorps anti-ICAM-1. Dr Martin Sirois et son laboratoire ont effectué les analyses histologiques. L'étude fut supervisée par Dr Philippe L'Allier, Dr Éric Rhéaume, Dr Frédéric Lesage et Dr Jean-Claude Tardif.

## **Dual intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence imaging (NIRF) of ICAM-1 for assessment of atheroma inflammation.**

Marie-Jeanne Bertrand MD, MSc<sup>1,2</sup>, Foued Maafi MSc<sup>1</sup>, Maxime Abran PhD<sup>1,3</sup>, David Busseuil PhD<sup>1</sup>, Nolwenn Merlet PhD<sup>1</sup>, Teodora Mihalache-Avram MSc<sup>1</sup>, Pascale Geoffroy MSc<sup>1</sup>, Pier-Luc Tardif MSc<sup>1,3</sup>, Abedelnasser Abulrob PhD<sup>4</sup>, Mehdi Arbabi-Ghahroudi PhD<sup>4</sup>, Martin G. Sirois PhD<sup>1,5</sup>, Philippe L. L'Allier MD<sup>1,2</sup>, Éric Rhéaume PhD<sup>1,2</sup>, Frédéric Lesage PhD<sup>1,3</sup>, and Jean-Claude Tardif MD<sup>1,2</sup>

**Word count** 5970

**Brief title** *In vivo* fluorescence imaging of ICAM-1 in atheroma.

### **Affiliations**

<sup>1</sup>Montreal Heart Institute, 5000 Belanger street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada

<sup>2</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada

<sup>3</sup>Département de Génie Électrique et Institut de Génie Biomédical, École Polytechnique de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada

<sup>4</sup>Department of Translational Biosciences, Human Health Therapeutics Research Centre, National Research Council of Canada, 1200 Chemin de Montréal, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada

<sup>5</sup>Département de pharmacologie et physiologie Montréal, Université de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada

## ABSTRACT

**Background:** *In vivo* molecular imaging is a promising strategy for the identification of inflamed atherosclerotic plaques that may trigger an acute coronary syndrome (ACS). This study aimed to assess atherosclerotic plaque inflammation *in vivo* in two distinct atherosclerotic animal species using a labeled-probe targeting intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) combined to a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) – near-infrared fluorescence (NIRF) imaging catheter.

**Methods and results:** Following local infusion of 11-4 single-domain antibody (sdAb) to ICAM-1 or its negative control in 16 balloon-injured distal abdominal rabbit aortas (0.4 mg) and in coronary arteries of 7 diabetic and hypercholesterolemic Yucatan mini-swine (0.2 mg), intravascular imaging was performed using a fully-integrated IVUS-NIRF imaging catheter. Peak *in vivo* NIRF signal was significantly higher in the ICAM-1 injected rabbits than in negative controls ( $3.1 \pm 0.7$  vs  $1.0 \pm 0.04$ ;  $P=0.03$ ). In mini-swine, NIRF signal was detected *in vivo* in 7/7 anti-ICAM-1 sdAb infused coronary arteries and in 2/5 negative controls ( $P=0.045$ ). *In vivo* NIRF signal was significantly correlated with the density of ICAM-1 detected by immunohistochemical staining in the neointima and media of the coronary arteries ( $R^2=0.81$ ;  $P=0.04$ ). *Ex vivo* total fluorescence signal was significantly higher with infusion of the anti-ICAM-1 sdAb than in control mini-swine ( $11.1 \pm 2.3$  versus  $1.0 \pm 1.0$ ;  $P=0.01$ ). *In vivo* and *ex vivo* fluorescence signals colocalized in both animal models and were spatially aligned.

**Conclusion:** *In vivo* IVUS-NIRF imaging following *in situ* infusion of low-dose ICAM-1-specific antibody to assess plaque inflammation was feasible in both diseased rabbit abdominal aortas and beating mini-swine coronary arteries.

**Key words:** molecular imaging, atherosclerosis, near-infrared fluorescence, intercellular adhesion molecule-1, single domain antibodies.

## ABBREVIATIONS LIST

ACS	Acute coronary syndrome
ACT	Activated clotting time
AR	Amplatz right
F	French
Fab	Fragment antigen-binding
FDA	Food and Drug Administration
FRI	Fluorescence reflectance imaging
HDL	High-density lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ICG	Indocyanine green
IM	Intramuscular
IVUS	Intravascular ultrasound
JR	Judkins right
LAD	Left anterior descending artery
LCx	Left circumflex artery
LDL	Low-density lipoprotein
MLD	Minimal lumen diameter
NIR	Near-infrared
NIRF	Near-infrared fluorescence
NPH	Neutral protamine hagedorn
NZW	New Zealand White
OCT	Optical coherence tomography
ORO	Oil red O
QCA	Quantitative coronary analysis
RCA	Right coronary artery
ROI	Region of interest
scFv	single-chain variable fragment
sdAb	Single domain antibody
SMC	Smooth muscle cell

TBR      Target-to-background ratio

## INTRODUCTION

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that affects millions of individuals worldwide. Recent development of intravascular imaging technologies enables visualization of coronary atherosclerosis by analyzing tissue composition and plaque burden, with the purpose of identifying vulnerable non-culprit plaques that could trigger future adverse events [1]. Multiple characteristics defining unstable plaques may serve as potential biomarkers for vulnerable plaque detection using catheter-based imaging technologies [2, 3].

Due to the inability of current single imaging modalities to predict plaque rupture in susceptible patients [4-7], the emergence of multimodal approaches for *in vivo* intracoronary imaging offers a synergistic evaluation of both plaque composition/biology and morphology that could provide new insights into high-risk features of atherosclerotic plaques [1]. Thus, novel hybrid imaging modalities combining different technologies integrated into a single catheter has the potential to fill a gap in our current knowledge of triggering factors for acute coronary syndrome (ACS) by overcoming the limitations of each individual imaging modality [8-12]. Near-infrared fluorescence (NIRF) allows visualization of pathobiological processes at all stages of atherogenesis with detection sensitivity at picomolar scale, thus adding information to structural images acquired by intravascular ultrasound (IVUS) and optical coherence tomography (OCT) [13, 14]. The use of infrared targeted-specific tracers coupled to a NIRF catheter system could enable specific imaging of molecular markers characterizing high-risk plaques, such as inflammation, apoptosis, oxidative stress and neoangiogenesis [14, 15].

We previously demonstrated the feasibility of an innovative intravascular imaging technique based on fluorescence-labeled anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-specific single-domain antibody (sdAb) infused in relatively small quantities at the vicinity of plaques in an endothelial-injured atheroma-bearing rabbit model for *in vivo* detection of atherosclerosis inflammation [16]. In addition, a custom IVUS-NIRF catheter enabled accurate NIRF signal detection following dual-injection of the molecular probes [16].

Hereby we sought to demonstrate the translation of a NIRF-labeled molecular tracer targeting specifically ICAM-1 in both an experimental endothelial-injury atherosclerotic rabbit model and a metabolic syndrome-like porcine model for *in vivo* detection of plaque inflammation using a custom fully-integrated real-time intravascular IVUS-NIRF imaging system.

## METHODS

The experimental protocols were approved by the animal ethics committee of the Montreal Heart Institute Research Center according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

**Rabbit model.** Atherosclerosis was induced by performing balloon denudation in the distal abdominal aorta of 21 male New Zealand White (NZW) rabbits (3 kg, aged 12-13 weeks; Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada), as previously described [16], which were then placed on a cholesterol-enriched diet (0.5% cholesterol, Harlan Teklad Diets, Madison, WI) for 12 consecutive weeks (Supplementary Figure 1).

**Swine model.** Eight (8) male miniature Yucatan swine (mean weight of 25 kg, 28 weeks of age; Sinclair Laboratories, Missouri, USA) were included in the study (Supplementary Figure 2). Diabetes was induced by Sinclair Laboratories using a single dose of alloxan (100-200 mg/kg intravenous (IV)) at approximately 20 weeks of age. All swine were given a high-fat diet containing 20% lard, 2% cholesterol and 1.5% sodium cholate (Modified Teklad Miniswine diet TD.150234, Harlan Laboratories Inc. WI) for the complete duration of the protocol. Body weight, fasting glucose levels and exogen insulin intake were closely monitored, and plasma lipid profile was assessed on a monthly basis (Table 1; Supplementary Figure 3). Follow-up duration was either 22 weeks (n = 3), 30 weeks (n = 1), 33 weeks (n = 1), 38 weeks (n = 1) or 41 weeks (n = 1).

### **Anti-ICAM-1 single-domain antibody (sdAb)**

Anti-ICAM-1 11-4 V<sub>H</sub>H sdAb was isolated from an immunized llama V<sub>H</sub>H library by panning against recombinant ICAM-1, as previously described [16, 17], and labeled with IRDye<sup>®</sup> 800CW (LI-COR Biosciences, MA) infrared dye, according to manufacturer's recommendations, for NIRF imaging (US patent: 8,623,369 B2). The negative control sdAb probe was prepared using a non-related sdAb against a bacterial toxin (*Clostridium difficile* toxin A) to avoid any risk of cross-reactivity with the mammalian protein *in vivo*.

### ***In vivo* intravascular ultrasound (IVUS) - near-infrared fluorescence (NIRF) imaging**

Of the 21 rabbits, five died after balloon denudation and were excluded; 16 animals were included in the study to perform *in vivo* imaging procedures at week 12. A total of 7 diabetic mini-swine underwent intracoronary imaging at different time points, whereas one animal died from a septic shock during the study period. Local infusion of anti-ICAM-1 sdAb molecular probe and its negative control was performed using a 20-mm-long semi-compliant microporous balloon catheter (ClearWay™ RX, Atrium Medical, NH) [18], as previously described [16]. A dose of 0.4 mg of anti-ICAM-1 sdAb was injected at the injured site of the rabbit's distal abdominal aorta upstream from the aorto-iliac bifurcation, while both anti-ICAM-1 11-4 and negative control were injected in the proximal segment of distinct coronary arteries, at a dosage of 0.2 mg.

*Ex vivo* FRI imaging, *ex vivo* 3D histology, immunohistochemical studies, fluorescence microscopy, histology and statistical analyses are described in further detail in the supplemental section.

## RESULTS

### ***Ex vivo* labeling of rabbit, mini-swine and human atherosclerotic tissue samples with NIRF anti-ICAM-1 11-4 sdAb**

Binding of the ICAM-1-targeting molecular probe to antigens in atheromatous rabbit aorta sections, as well as in both diabetic and hypercholesterolemic mini-swine and human atherosclerotic coronary arteries was validated prior to performing *in vivo* NIRF imaging. Figure 1 shows binding of the molecular imaging tracer, with focal staining of ICAM-1 in the intima and media of atheromatous rabbit aorta section (Figure 1A), of diseased mini-swine coronary artery (Figure 1B) and human atherosclerotic coronary artery (Figure 1C).

### ***In vivo* IVUS-NIRF imaging with anti-ICAM-1 sdAb targeting inflamed plaques in rabbits and mini-swine**

#### **Rabbit – balloon injury model**

To determine whether anti-ICAM-1 sdAb labeled molecular probe could enable *in vivo* atherosclerosis detection, intravascular IVUS-NIRF was performed following local tracer delivery to simultaneously image plaque morphology and inflammation. *In vivo* images were safely acquired in all 16 atherosclerotic male NZW rabbits immediately following *in situ* infusion of anti-ICAM-1 11-4 sdAb probe in the deendothelialized area of the distal abdominal aorta (40-mm upstream from the aorto-iliac bifurcation) and then serially over a 40-minute period (Supplementary Figure 1). The bimodal intra-arterial catheter enabled simultaneous acquisition of IVUS and NIRF images of diseased aortas, revealing focal signals within the injured zone. Strong NIRF activity was present in IVUS-visualized plaques, whereas nearly undetectable signal was obtained in negative control infused abdominal aortas. Peak *in vivo* NIRF signal was significantly higher in the ICAM-1 injected rabbits than in negative control ( $3.1 \pm 0.7$  versus  $1.0 \pm 0.04$ ;  $P=0.03$ ; Figure 2A).

#### **Mini-swine – metabolic syndrome-like model**

Intracoronary imaging was performed in 7 diabetic and atheromatous mini-swine. In order to evaluate plaque inflammation at different stages of atherogenesis, IVUS-NIRF imaging was conducted at different time points, specifically at 22 weeks (n=3), 30 weeks (n=1), 33 weeks (n=1), 38 weeks (n=1) and 41 weeks (n=1). Integrated IVUS-NIRF imaging was performed immediately following infusion of the anti-ICAM-1 11-4 sdAb probe in 7 distinct coronary arteries or the negative control (5 distinct coronary arteries). The dual-mode imaging catheter allowed simultaneous IVUS and NIRF imaging in the proximal segment of coronary arteries. *In vivo* NIRF signal was detected in IVUS-visualized plaque in 7/7 coronary arteries where the anti-ICAM-1 sdAb was infused and in 2/5 negative controls (P=0.045). However, the difference in peak NIRF signal was not statistically significant between groups due to both the presence of focal and diffuse NIRF signal in two coronary arteries from distinct animals in the negative control group and to signal loss resulting in the limited catheter-to-vessel wall distance ( $1.4 \pm 0.4$  versus  $1.0 \pm 0.2$ ; P=0.88; Figure 2C). *In vivo* NIRF signal was significantly correlated with the density of ICAM-1 detected by immunohistochemical staining in the neointima and media of the coronary arteries ( $R^2=0.81$ ; P=0.04) (Figure 2E).

### ***Ex vivo* FRI for the validation of *in vivo* NIRF imaging**

Following *in vivo* dual-mode imaging, FRI of resected aortas was performed for intravascular imaging validation. First, the *ex vivo* average total NIRF signal was 13.8-fold greater with the anti-ICAM-1 sdAb probe than the negative control in diseased rabbit aortas but the difference did not reach statistical significance ( $13.8 \pm 6.4$  versus  $1.0 \pm 0.9$ ; P=0.07; Figure 2B). FRI of resected abdominal aortas revealed the presence of NIRF signal within lipid-rich areas visible in white-light images, whereas the signal intensity of anti-ICAM-1 probe tended to be stronger in arterial segments with important plaque burden (Figure 3A). NIRF signals were nearly undetectable in the negative control group, as shown on Figure 3B. Outlier values were obtained from 3 distinct aortas due to the absence of signal as a result of the absence of atheroma plaque. Hence those values were discarded from the final analysis.

In coronary arteries of diabetic mini-swine, the *ex vivo* average total NIRF signal was significantly higher with infusion of the anti-ICAM-1 sdAb probe than in the control group ( $11.1 \pm 2.3$  versus  $1.0 \pm 1.0$ ;  $P=0.01$ , Figure 2D). *In vivo* and *ex vivo* fluorescence signals colocalized in both animal models and were properly aligned, taking into account *post-mortem* average tissue shrinkage estimated at approximately 30%. *Ex vivo* FRI showed strong focal NIRF signals within coronary plaques which colocalized with *in vivo* NIRF signal in atheroma plaques seen by IVUS (Figure 3C). There was no signal observed in 3 negative control coronary arteries (Figure 3D), however *post-mortem* focal and diffuse signal was seen in two distinct coronary artery segments from 2 mini-swine (data not shown).

## **Co-registration of NIRF imaging and histology validation**

### **Rabbit – balloon injury model**

Figure 4 illustrates an example of NIRF signal colocalization following *in situ* infusion of anti-ICAM-1 11-4 sdAb in the distal abdominal aorta of a diseased rabbit. Baseline angiography (Figure 4A) was performed for accurate positioning of the porous-balloon delivery catheter above the aorto-iliac bifurcation, in the balloon injury zone (yellow line) displaying lipid-rich segments shown on white light image (Figure 4B). A strong NIRF signal was obtained by *ex vivo* FRI in the aorta (Figure 4C-D), which matched the *in vivo* NIRF signal location obtained with the dual IVUS-NIRF imaging catheter (Figure 4E). *In vivo* NIRF correlated with plaque visualized by IVUS, which allowed anatomical co-registration of NIRF signal (Figure 4F). Histopathology analyses and staining with RAM-11 showed colocalization of the labeled imaging agent within lipid-rich plaque areas infiltrated with macrophages in rabbit atheroma (Figure 4G-I). Target validation studies previously demonstrated the *in vitro* affinity of anti-ICAM-1 antibody in endothelial cells in rabbit's atherosclerotic plaques [19].

### **Mini-swine – metabolic syndrome-like model**

In order to evaluate temporal characteristics of atheroma inflammation in coronary arteries, invasive imaging was scheduled at different time-points in the 7 male diabetic and atherosclerotic Yucatan mini-swine (Supplementary Figure 2). Figure 5 represents

colocalization of NIRF signal detected at the site of a severe coronary stenosis located in the left circumflex coronary artery following ICAM-1-targeting sdAb probe, as delineated by an eccentric hyperechogenic region seen on IVUS and a homogenous high-backscattering signal on OCT cross-sectional images (Figure 5A-C). Intravascular IVUS-NIRF imaging performed immediately following *in situ* delivery of the imaging tracer revealed a strong NIRF signal throughout the catheter pullback length (Figure 5D), with good visual correspondence between both *in vivo* and *ex vivo* signals obtained by FRI imaging of the entire coronary artery (Figure 5E). Corresponding histological sections showed an advanced atherosclerotic plaque with high density of collagen (Figure 5F).

IVUS and OCT were performed in the selected coronary arteries prior to the use of anti-ICAM-1 sdAb probe. One to two non-stenotic focal plaques were observed in each coronary artery, predominantly in the proximal segment and/or at the vicinity of a side branch or bifurcation. Due to technical difficulties, IVUS, OCT and IVUS-NIRF could not be performed in all epicardial coronary arteries of the 7 mini-swine. Image quality was superior with OCT compared to IVUS in swine beating hearts. As shown in Figure 6, OCT demonstrated focal lesions in all swine that varied in location, morphology, abundance and degree of severity, according to the number of weeks under protocol. The presence of lipid-laden eccentric lesions was observed from 22 to 41 weeks, as shown by a low-backscattering region on OCT imaging. Plaque burden was highly variable between swine, notably between two animals imaged at 22 weeks, with one displaying an advanced complex calcified atheroma plaque (as confirmed with Von Kossa staining) while the other only had a focal non-stenotic early atheroma lesion.

### **3D histology for validation of *in vivo* NIRF signal in mini-swine coronary atherosclerosis**

*Ex vivo* massive 3D histology, as previously described by Tardif and colleagues [19], was performed to further validate the specificity and spatial co-localization of the NIRF signal obtained with the anti-ICAM-1 sdAb probe. The complete reconstruction of the coronary artery by an imaging method combining both OCT and fluorescence confocal microscopy allowed visualization of the complete architecture of the diseased vessel as well as its

molecular composition. *Ex vivo* NIR-fluorescent signal was predominantly located at the surface of the arterial wall, both on cross-sectional images and longitudinal reconstruction (Figure 7A-B), suggesting that the imaging tracer targets specifically the ligand at the surface of lipid plaques. As illustrated in Figure 7C-D, *ex vivo* fluorescence signal co-localized with ICAM-1 predominantly at the surface of the diseased arterial wall on immunostained sections.

## DISCUSSION

In this work, we demonstrated the feasibility of *in vivo* IVUS-NIRF imaging using a small quantity of an anti-ICAM-1 sdAb labeled-specific NIRF tracer to assess plaque inflammation *in situ* in two experimental accelerated atherosclerotic animal models with distinct plaque phenotypes.

Intravascular NIRF paired to specific fluorescent imaging probes has the potential to enable early clinical diagnosis and impact prognosis and treatment prior to acute cardiac ischemic events [13]. However, the translation of NIRF imaging into the cardiac catheterization laboratory is currently limited by the absence of clinically approved signal-enhancing tracers due to the risk of systemic toxicity, the weak sensitivity of detection of current molecular imaging tracers through blood (weak signal-to-noise), the significant development costs and arduous regulatory processes [14, 20, 21]. In order to overcome these limitations, we developed a technique for local infusion of a novel sdAb-based molecular probe targeting ICAM-1 at the site of an atherosclerotic plaque to minimize potential adverse effects, optimize biodistribution and diffusion of the imaging tracer in the region of interest and thus to reduce the imaging acquisition time for *in vivo* imaging. While using a predefined dosage based on previous studies performed in small animals, local injection of anti-ICAM-1 sdAb offered enough time for the labeled probe to target its ligand and, accordingly, intravascular IVUS-NIRF imaging showed *in vivo* signal in atheroma plaques confirmed by OCT and/or IVUS in both rabbit abdominal aortas and mini-swine coronary arteries. The findings were subsequently validated by matching *in vivo* NIRF to *ex vivo* FRI signals, which showed ICAM-1 signal correspondence in both abdominal rabbit aortas and mini-swine coronary arteries. Furthermore, immunostaining analyses demonstrated that the anti-ICAM-1 sdAb tracer preferentially binds to lipid-rich plaques containing macrophages in diseased rabbit aortas, key features of plaque inflammation. Colocalization of *ex vivo* fluorescent signal detected by *in vivo* NIRF was further validated in porcine coronary arteries using a novel 3D histology imaging platform, providing spatial context, whereas the signal detected at the surface of the imaged plaque

led us to believe that the labeled-tracer specifically binds to ICAM-1, as confirmed by subsequent immunostaining analysis.

While most of the previous studies on atherosclerosis molecular imaging were performed in mice [22-26], translation to larger animals and humans will require solving molecular probe dosage issues. Previous studies in larger species were limited to FDA-approved, non-specific ICG, preventing the use and validation of novel agents in disease models that better mimic human atherosclerotic phenotype [27-30]. From a cost-effectiveness standpoint, the development and production of biocompatible and non-toxic labeled-specific imaging tracers that could generate a specific signal with high-sensitivity of detection, while administered in relatively low total quantity at the vicinity of a plaque seems to be an attractive approach for future clinical applications aiming to image arterial inflammation in human coronary atheroma plaques.

ICAM-1, expressed at the surface of endothelial cells, is involved in atherosclerotic plaque formation and progression upon up-regulation following exposure to pro-inflammatory stimuli [31]. It has been previously demonstrated that the expression levels of ICAM-1 correlates with the severity of the disease [32]. For the purpose of imaging the evolution of inflammation in atherosclerotic coronary arteries, invasive IVUS-NIRF imaging was performed at different time points by specifically targeting ICAM-1 in a metabolic-like syndrome porcine model. Although the sample size was small, the intensity of NIRF signal detected by the catheter tended to increase according to the stage of atheroma plaque development as well as the duration of both the state of hyperglycemia and hypercholesterolemia, which makes it a compelling animal model for subsequent studies of spatial and temporal characteristics of inflammation. Furthermore, results showing NIRF signal with ICAM-1-targeting probe in two distinct animal models that developed early and/or more advanced plaques suggests that ICAM-1 is indeed involved at different stages of atherosclerosis development. This finding contrasts with results previously published by Cybulsky and colleagues in a mouse model ICAM-1/Ldlr<sup>-/-</sup> [23]. Several factors could explain the differences in ICAM-1 involvement in atherosclerosis development, including the variability in atherosclerosis initiation and the level of

expression of ICAM-1 at the endothelial surface depending of the animal species, the experimental atherosclerotic model (endothelial injury vs. induced diabetes +/- hypercholesterolemic diet) as well as the type and duration of the diet fed to the animals [33]. van Ditzhuijzen and colleagues previously showed no difference in the onset of early atherosclerosis between diabetic and non-diabetic swine [34], with the hypothesis that hyperglycemia may have a protective effect in the early stages of atherogenesis, as described in rabbits [34]. It is plausible that type 1 diabetes induced in the porcine model, which led to marked variations in the amount of exogenous insulin administered to each mini-swine having different baseline levels of endogenous insulin, modulated ICAM-1 expression levels. Interestingly, coronary lesions exhibiting complex features such as calcifications and lipid-rich core were found in animals with undetectable levels of endogenous insulin at baseline. Furthermore, it was previously demonstrated that mechanical endothelial injury induces the expression of high levels of ICAM-1 in the denuded neointimal endothelium, which may explain the stronger fluorescent signal observed in the atheromatous balloon-injured rabbit aortas by comparison to a rather “natural” evolution of coronary atherosclerosis in diabetic mini-swine [35].

These preliminary results describe an *in vivo* molecular imaging application that could translate to future human studies with the purpose of identifying key biological processes involved in human coronary atherosclerotic plaque instability and offer tailored therapeutics to vulnerable patients. Ideally, the preliminary findings from the swine model should be validated in a longitudinal study with a larger number of animals using different ICAM-1 probe dosages combined to a coronary artery-compatible NIRF catheter.

## LIMITATIONS

First, the susceptibility of animal models to develop atherosclerosis induced by high-fat diet, combined to balloon-injury, confer an important heterogeneity between animals of the same breed, which represents a major limitation in the reproducibility of the model. Moreover, variability in the abundance of plaques, location and degree of complexity was observed between the diabetic mini-swine, including in those imaged at 22 weeks (N=3), although their age, breed, diet and caloric intake were identical. Second, the technical complexities of invasive procedures in mini-swine rendered difficult to perform all intravascular imaging modalities in a single animal. Third, the rigidity and large diameter of the optical fiber within the current IVUS-NIRF catheter precluded its advancement beyond the proximal segment of coronary arteries and induced, at some extent, coronary dissection and vasospasm. Hence hemodynamic instability and stagnation of coronary blood flow contributed to local accumulation anti-ICAM-1 within the artery, generating a strong NIRF signal (false positive) and thus rendering results not interpretable in these instances. Fourth, since images were acquired immediately following *in situ* infusion of a single dosage of ICAM-1 probe in mini-swine's coronary arteries, it is possible that optimal timing for intravascular imaging is beyond a few minutes and therefore, tracer dosage needs further evaluation.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank all personal members of the Research Centre of the Montreal Heart Institute for their participation in animal preparation and care. We also thank Marie-Elaine Clavet for her assistance in histopathology analysis.

## **SOURCE OF FUNDING**

This research was supported by the University of Montreal Endowed Research Chair in atherosclerosis and the Canada Research Chair in translational and personalized medicine to Dr Jean-Claude Tardif, a NSERC Canada Research Chair in Optical Vascular Imaging and CIHR grant to Dr Frédéric Lesage. Dr Abedelnasser Abulrob was supported by the Biologics and Biomanufacturing Program of the National Research Council of Canada. There is no relationship with the industry to declare.

## **DISCLOSURES**

M-J.B., F.M., M.A., P-L.T., N.M., D.B., P.G., T.A-M., A.A., M.A-G., M.G. S., P.L.L., E.R., F.L. and J-C.T. have no financial and non-financial competing interests to declare.

## REFERENCES

1. van Soest G, Marcu L, Bouma BE, Regar E. Intravascular imaging for characterization of coronary atherosclerosis. *Curr Opin Biomed Eng.* 2017; 3:1-12. doi: 10.1016/j.cobme.2017.07.001.
2. Puri R, Niholls SJ, Ellis SG, Tuzcu EM, Kapadia SR. High-risk coronary atheroma. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63:1134-40. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.088.
3. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1262-75. doi: 10.1161/01.ATV.20.5.1262.
4. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, Mehran R, McPherson J, Farhat N, Marso SP, Parise H, Templin B, White R, Zhang Z, Serruys PW; PROSPECT Investigators. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; 364:226-35. doi: 10.1056/NEJMoa1002358.
5. Calvert PA, Obaid DR, O'Sullivan M, Shapiro LM, McNab D, Densem CG, Schofield PM, Braganza D, Clarke SC, Ray KK, West NE, Bennett MR. Association between virtual histology intravascular ultrasound findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011; 4:894-901. doi: 10.1016/j.jcmg.2011.05.005.
6. Stone PH, Saito S, Takahashi S, Makita Y, Nakamura S, Kawasaki T, Takahashi A, Katsuki T, Nakamura S, Namiki A, Hirohata A, Matsumura T, Yamazaki S, Yokoi H, Tanaka S, Otsuji S, Yoshimachi F, Honye J, Harwood D, Reitman M, Coskun AU, Papafaklis MI, Feldman CL; PREDICTION Investigators. Prediction of progression of coronary artery disease and clinical outcomes using vascular profiling of endothelial shear stress and arterial plaque characteristics: the PREDICTION study. *Circulation.* 2012; 126:172-81. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.096438.
7. Cheng JM, Garcia-Garcia HM, de Boer SP, Kardys I, Heo JH, Akkerhuis KM, Oemrawsingh RM, van Domburg RT, Ligthart J, Witberg KT, Regar E, Serruys PW, van Geuns RJ, Boersma E. In vivo detection of high-risk coronary plaques by radiofrequency intravascular ultrasound and cardiovascular outcome: results of the

- ATHEROREMO-IVUS study. *Eur Heart J.* 2014; 35:639-47. doi: 10.1093/eurheartj/eht484.
8. Li J, Li X, Mohar D, Raney A, Jing J, Zhang J, Johnston A, Liang S, Ma T, Shung KK, Mahon S, Brenner M, Narula J, Zhou Q, Patel PM, Chen Z. Integrated IVUS-OCT for real-time imaging of coronary atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2014; 7:101-3. doi: 10.1016/j.jcmg.2013.07.012.
  9. Fard AM, Vacas-Jacques P, Hamidi E, Wang H, Carruth RW, Gardecki JA, Tearney GJ. Optical coherence tomography – near infrared spectroscopy system and catheter for intravascular imaging. *Opt Express.* 2013; 21:30849-58. doi: 10.1364/OE.21.030849.
  10. Dixon AJ, Hossack JA. Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *J Biomed Opt.* 2013; 18:56009. doi: 10.1117/1.JBO.18.5.056009.
  11. Abran M, Cloutier G, Roy Cardinal MH, Chayer B, Tardif JC, Lesage F. Development of a photoacoustic, ultrasound and fluorescence imaging catheter for the study of atherosclerotic plaque. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst.* 2014; 8:696-703. doi: 10.1109/TBCAS.2014.2360560.
  12. Ughi GJ, Wang H, Gerbaud E, Gardecki JA, Fard AM, Hamidi E, Vacas-Jacques P, Rosenberg M, Jaffer FA, Tearney GJ. Clinical characterization of coronary atherosclerosis with dual-modality OCT and near-infrared autofluorescence imaging. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2016; 9:1304-1314. doi: 10.1016/j.jcmg.2015.11.020.
  13. Jaffer FA, Verjans JW. Molecular imaging of atherosclerosis: clinical state-of-the-art. *Heart.* 2014; 100:1469-77. doi: 10.1136/heartjnl-2011-301370.
  14. Calfon MA, Vinegoni C, Ntziachristos V, Jaffer FA. Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques. *J Biomed Opt.* 2010; 15:011107. doi: 10.1117/1.3280282.
  15. Yoo H, Kim JW, Shishkov M, Namati E, Morse T, Shubochkin R, McCarthy JR, Ntziachristos V, Bouma BE, Jaffer FA, Tearney GJ. Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo. *Nat Med.* 2011; 17:1680-85. doi: 10.1038/nm.2555.

16. Bertrand MJ, Abran M, Maafi F, Busseuil D, Merlet N, Mihalache-Avram T, Geoffroy P, Tardif PL, Abulrob A, Arbabi-Ghahroudi M, Ni F, Sirois M, L'Allier PL, Rhéaume E, Lesage F, Tardif JC. In vivo near-infrared fluorescence imaging of atherosclerosis using local delivery of novel targeted molecular probes. *Sci Rep.* 2019; 9:2670. doi: 10.1038/s41598-019-38970-4.
17. Baral TN, MacKenzie R, Arbabi-Ghahroudi M. Single-domain antibodies and their utilities. *Curr Protoc Immunol.* 2013;103:Unit 2.17. doi: 10.1002/0471142735.im0217s103.
18. Saraf S, Ong PJ, Gorog DA. ClearWay RX – Rapid exchange therapeutic perfusion catheter. *EuroIntervention.* 2008; 3:639-42. doi: 10.4244/EIJV3I5A114.
19. Tardif PL, Bertrand MJ, Abran M, Castonguay A, Lefebvre J, Stähli BE, Merlet N, Mihalache-Avram T, Geoffroy P, Mecteau M, Busseuil D, Ni F, Abulrob A, Rhéaume E, L'Allier P, Tardif JC, Lesage F. Validating intravascular imaging with serial optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy. *Int J Mol Sci.* 2016; 17:2110. doi: 10.3390/ijms17122110.
20. Jaffer FA, Libby P, Weissleder. Molecular imaging of cardiovascular disease. *Circulation.* 2007; 116:1052-1061. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.647164.
21. Agdeppa ED, Spilker ME. A review of imaging agent development. *AAPS J.* 2009; 11:286-299. doi: 10.1208/s12248-009-9104-5.
22. Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E, Kim DE, Ntziachristos V, Weissleder R, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation.* 2006; 114:55-62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.619056.
23. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 107:1255-1262. doi: 10.1172/JCI11871.
24. Kim DE, Kim JY, Schellingerhout D, Kim HK, Lee S, Kim K, Kwon IC, Shon SM, Jeong SW, Im SH, Lee DK, Lee MM, Kim GE. Protease imaging of human atheromata captures molecular information of atherosclerosis, complementing anatomic imaging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:449-456. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.194613,

25. Nahrendorf M, Jaffer FA, Kelly KA, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Weissleder R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*. 2006; 114:1504-1511. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646380.
26. Khamis RY, Woollard KJ, Hyde GD, Boyle JJ, Bicknell C, Chang SH, Malik TH, Hara T, Mauskopf A, Granger DW, Johnson JL, Ntziachristos V, Matthews PM, Jaffer FA, Haskard DO. Near infrared fluorescence (NIRF) molecular imaging of oxidized LDL with an autoantibody in experimental atherosclerosis. *Sci Rep*. 2016; 6:21785. doi: 10.1038/srep21785.
27. Lee S, Lee MW, Cho HS, Song JW, Nam HS, Oh DJ, Park K, Oh WY, Yoo H, Kim JW. Fully integrated high-speed intravascular optical coherence tomography/near-infrared fluorescence structural/molecular imaging in vivo using a clinically available near-infrared fluorescence-emitting indocyanine green to detect inflamed lipid-rich atheromata in coronary-sized vessels. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014; 7:560-69. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.001498.
28. Vinegoni C, Botnaru I, Aikawa E, Calfon MA, Iwamoto Y, Folco EJ, Ntziachristos V, Weissleder R, Libby P, Jaffer FA. Indocyanine green enables near-infrared fluorescence imaging of lipid-rich, inflamed atherosclerotic plaques. *Sci Transl Med*. 2011; 3:84ra45. doi: 10.1126/scitranslmed.3001577.
29. Kim S, Lee MW, Kim TS, Song JW, Nam HS, Cho HS, Jang SJ, Ryu J, Oh DJ, Gweon DG, Park SH, Park K, Oh WY, Yoo H, Kim JW. Intracoronary dual-modal optical coherence tomography-near-infrared fluorescence structural-molecular imaging with a clinical dose of indocyanine green for the assessment of high-risk plaques and stent-associated inflammation in a beating coronary artery. *Eur Heart J*. 2016; 37:2833-44. doi: 10.1093/eurheartj/ehv726.
30. Verjans JW, Osborn EA, Ughi GJ, Calfon Press MA, Hamidi E, Antoniadis AP, Papafaklis MI, Conrad MF, Libby P, Stone PH, Cambria RP, Tearney GJ, Jaffer FA. Targeted near-infrared fluorescence imaging of atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2016; 9:1087-95. doi: 10.1016/j.jcmg.2016.01.034.
31. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 2009; 61:22-32. doi: 10.1016/S1734-1140(09)70004-0.

32. Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, Hashimoto H, Kuwabara K, Ohtsuki T, Hori M. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis*. 2002; 160:305-310. doi: 10.1016/S0021-9150(01)00587-1.
33. van Ditzhuijzen NS, van den Heuvel M, Sorop O, Rossi A, Veldhof T, Bruining N, Roest S, Ligthart JMR, Witberg KT, Dijkshoorn ML, Neiman K, Mulder MT, Zijlstra F, Duncker DJ, van Beusekom HMM, Regar E. Serial coronary imaging of early atherosclerosis development in fast-food-fed diabetic and nondiabetic swine. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science*. 2016; 1:449-460. doi: 10.1016/j.jacbts.2016.08.006.
34. Duff GL, Mc MG. The effect of alloxan diabetes on experimental cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *J Exp Med*. 1949; 89:611-630. doi: 10.1084/jem.89.6.611.
35. Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation*. 1993; 88:1788-1803. doi: 10.1161/01.CIR.88.4.1788.

## FIGURE LEGENDS

1. *Ex vivo* binding anti-ICAM-1 sdAb to atherosclerotic lesions across animal species.
2. *In vivo* and *ex vivo* NIRF signal intensity of anti-ICAM-1 sdAb in both animal models and *in vivo* NIRF signal correlation with ICAM-1 quantification in mini-swine coronary arteries.
3. *Ex vivo* FRI validation of *in vivo* NIRF in both rabbit aortas and mini-swine coronary arteries.
4. NIRF imaging of anti-ICAM-1 sdAb in rabbit abdominal aortas.
5. Colocalization of NIRF imaging of ICAM-1 in mini-swine coronary arteries.
6. *In vivo* NIRF signal and ICAM-1 quantification following plaque evolution in mini-swine coronary arteries.
7. 3D histology validation of *in vivo* NIRF signal in coronary arteries of diabetic swine.

## TABLE LEGEND

1. Swine's individual biological profile at time of sacrifice and AHA coronary artery plaque staging.

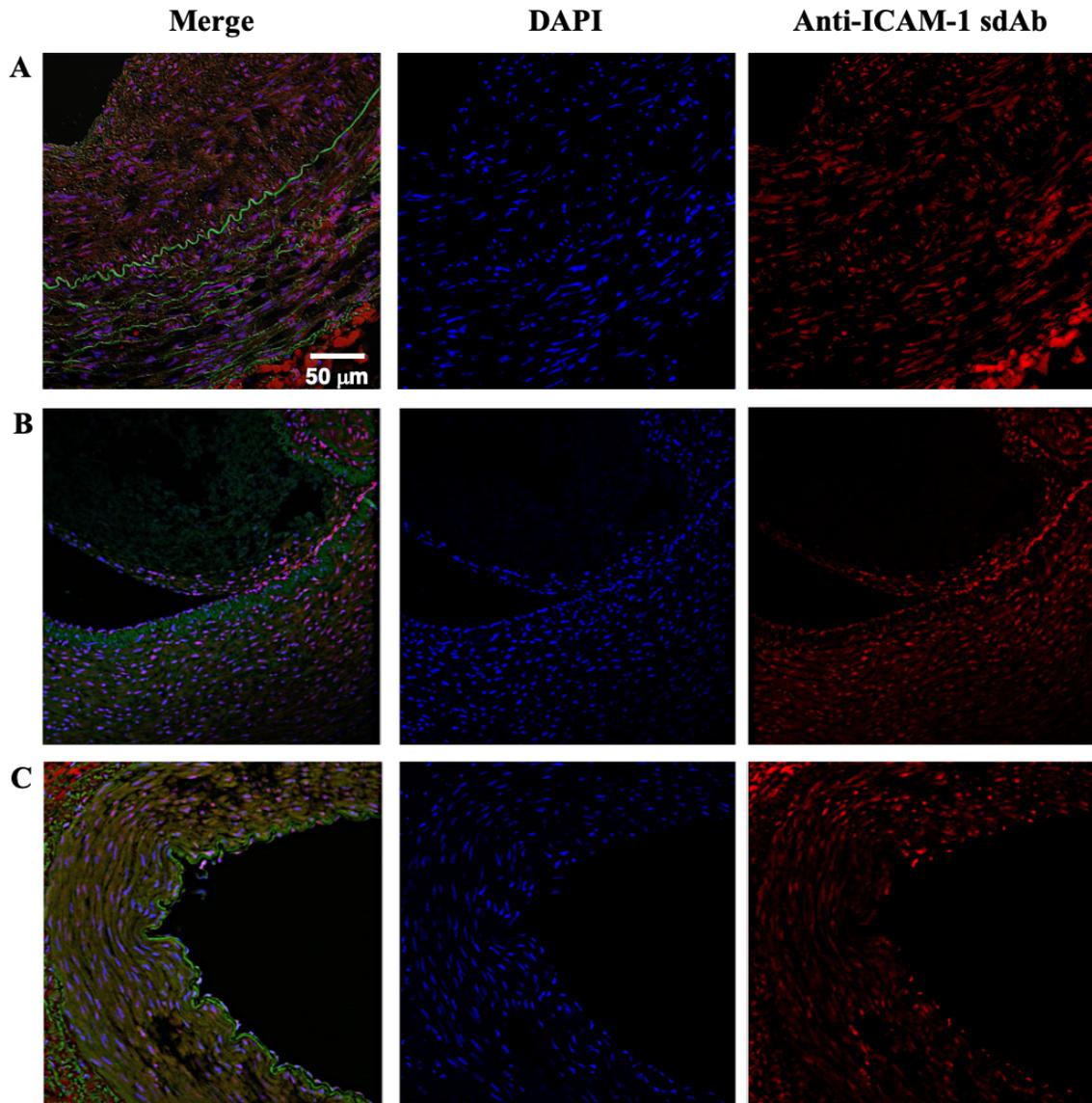
## TEXT TABLES

Characteristics/Swine numbers	1	2	3	4	5	6	7	8
Timing to sacrifice	W22	W22	W22	W30	W33	W38	W41	-
Insulin level (pmol/L)	<1	15	12	<1	<1	<1	21	14
Total insulin given (U)	1873	1145	2350	7	2996	3230	3596	2343
Weight (Kg)	42.1 ± 9.3	34.9 ± 2.2	43.8 ± 9.5	60.5 ± 19.6	38.2 ± 4.0	38.4 ± 7.6	39.6 ± 5.7	37.3 ± 3.3
Lipid profile (mmol/L)								
Total cholesterol	19.2 ± 3.5	15.6 ± 2.7	19.6 ± 3.8	20.1 ± 3.6	15.8 ± 2.3	24.0 ± 7.6	19.7 ± 7.2	15.9 ± 1.1
LDL	10.7 ± 4.5	8.9 ± 2.3	12.3 ± 2.8	13.1 ± 2.8	8.9 ± 3.0	17.0 ± 6.3	14.6 ± 7.2	7.5 ± 0.9
HDL	8.2 ± 2.2	6.1 ± 1.1	7.0 ± 1.0	6.7 ± 1.3	6.1 ± 1.5	6.5 ± 1.9	6.4 ± 2.7	7.0 ± 2.0
Triglycerides	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.6	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.4	1.7 ± 1.3	1.3 ± 0.6	2.9 ± 1.4	2.5 ± 1.7
Non-HDL	11.0 ± 4.6	9.5 ± 2.4	12.6 ± 2.8	13.4 ± 2.8	9.7 ± 3.0	19.1 ± 5.7	14.2 ± 7.1	8.9 ± 1.9
AHA plaque staging								
RCA	NA	NA	NA	NA	V Ca <sup>++</sup>	NA	NA	NA
LAD	NA	III	NA	IV	IV	NA	IV	NA
Left circumflex	III	NA	III	V Ca <sup>++</sup>	V Ca <sup>++</sup>	V Ca <sup>++</sup>	III	NA

**Table 1. Swine's individual biological profile at time of sacrifice and AHA coronary artery plaque staging.**

Represents baseline plasma insulin levels and total amount of insulin received during the study period. The average weight, complete lipid profile and glucose levels, and AHA plaque staging [4] observed at the time of sacrifice for each swine. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Swine number 8 died from sepsis at W8. Ca<sup>++</sup>, calcium; HDL, high-density lipoprotein; LAD, left anterior descending artery; LDL, low-density lipoprotein; NA, non-available; RCA, right coronary artery; W, weeks.

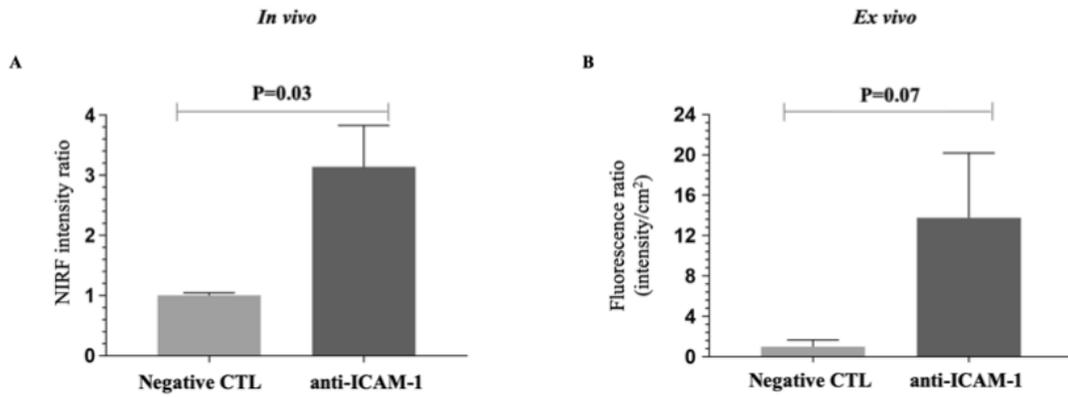
## FIGURES



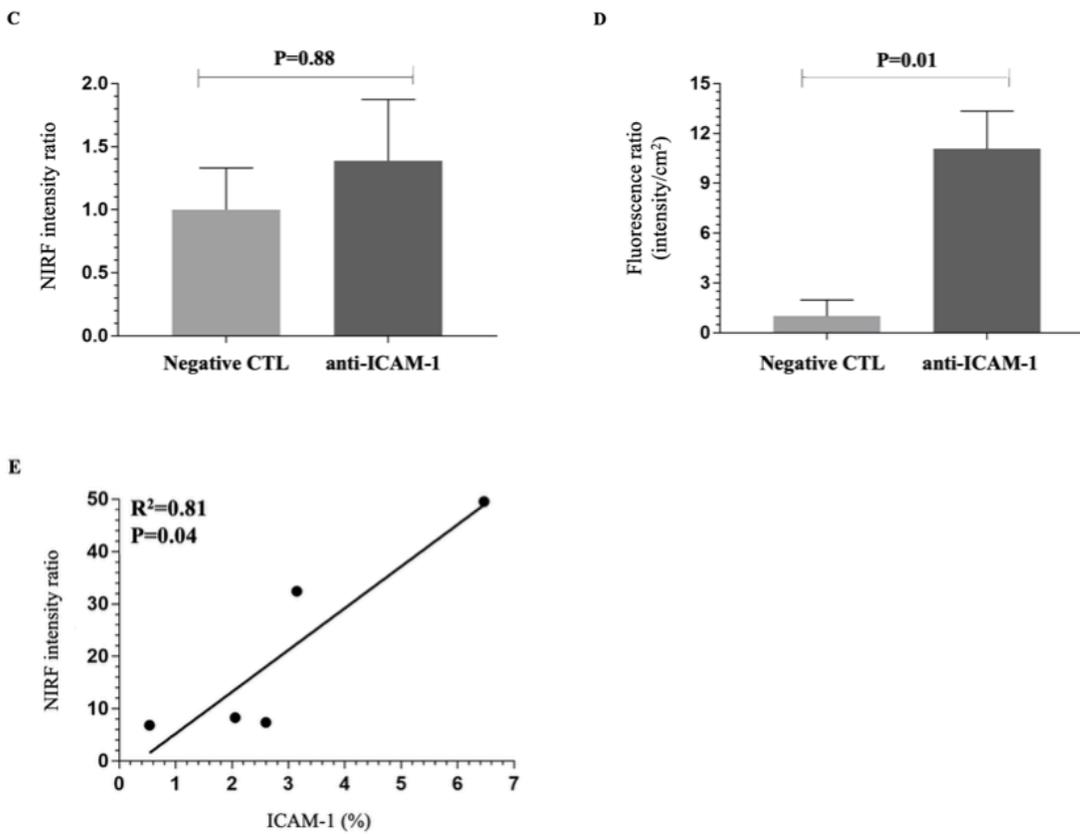
**Figure 1. *Ex vivo* binding anti-ICAM-1 sdAb to atherosclerotic lesions across animal species.**

Cryosections with anti-ICAM-1 sdAb staining of: (A) atherosclerotic rabbit aorta; (B) atherosclerotic swine coronary artery; (C) human atherosclerotic coronary artery. The right panel shows fluorescence signal from the molecular probe targeting ICAM-1. The left panel shows a merged image of both DAPI and the NIR-fluorescent tracer. The cell nuclei (blue) were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate).

**Rabbit model**



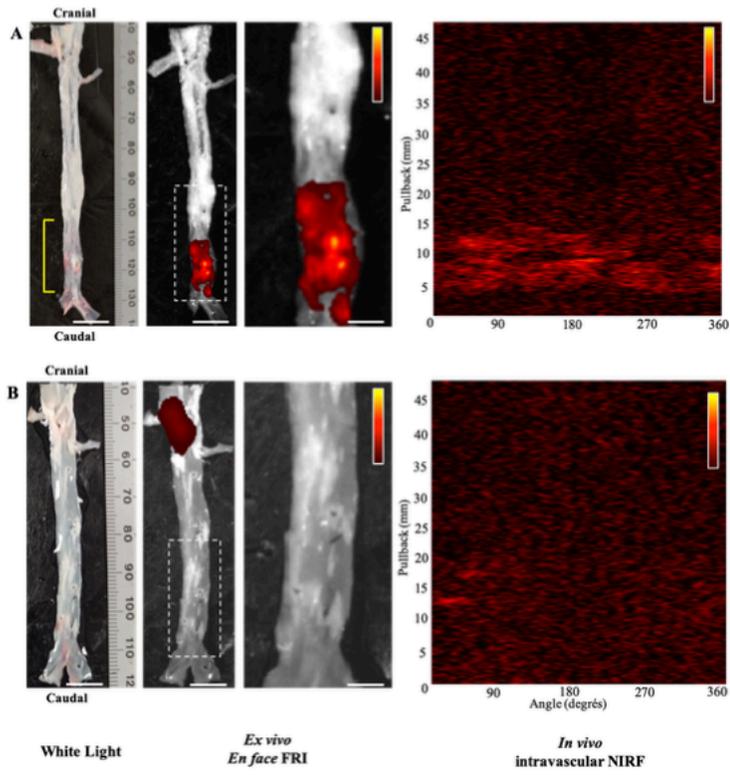
**Mini-Swine model**



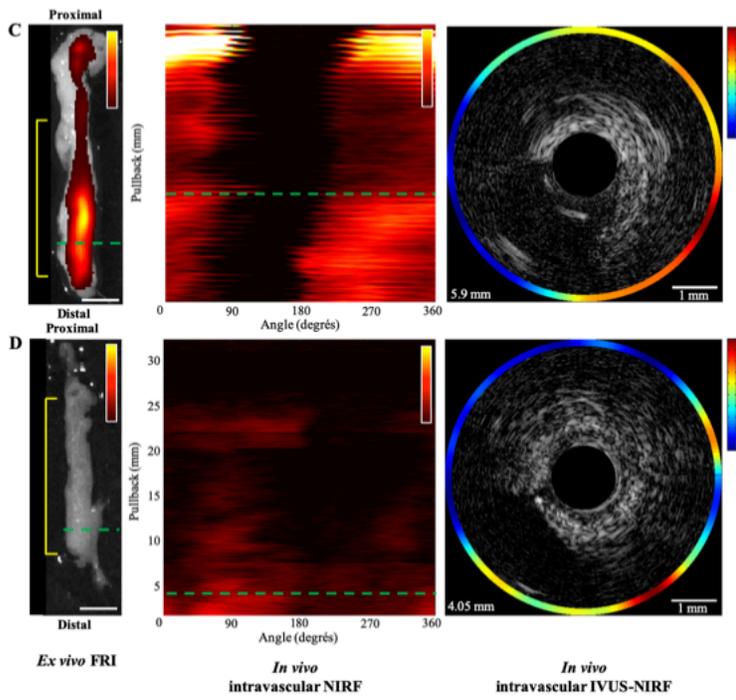
**Figure 2.** *In vivo* and *ex vivo* NIRF signal intensity of anti-ICAM-1 sdAb in both animal models and *in vivo* NIRF signal correlation with ICAM-1 quantification in min-swine coronary arteries.

Shows intensity profile of *in vivo* peak NIRF (**A**, **C**) and *ex vivo* total fluorescence signals (**B**, **D**) between ICAM-1 probe and its respective negative control in both diseased rabbit abdominal aortas (upper panel) and mini-swine's coronary arteries (lower panel). (**E**) Pearson correlation analysis between *in vivo* NIRF signal intensity and the percentage of ICAM-1 measured by immunostaining analyses. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). CTL, control.

**Rabbit model**

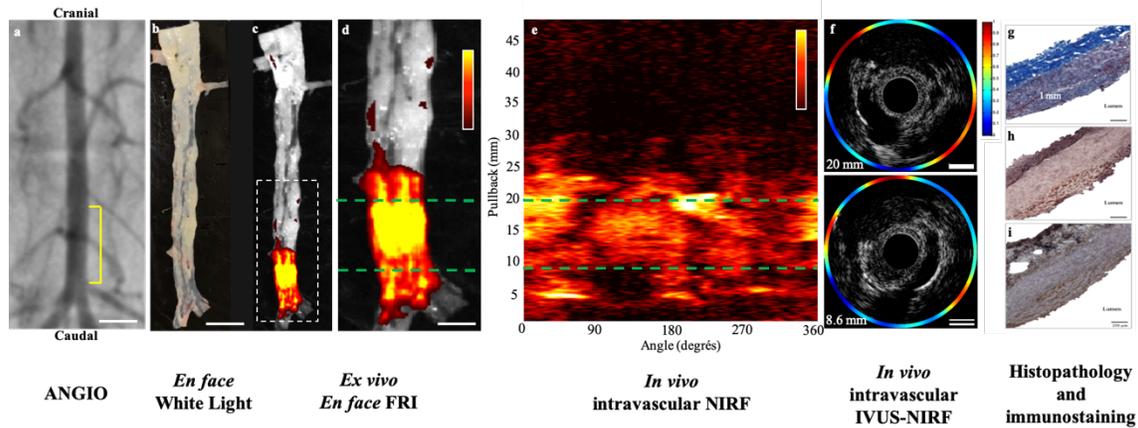


**Mini-Swine model**



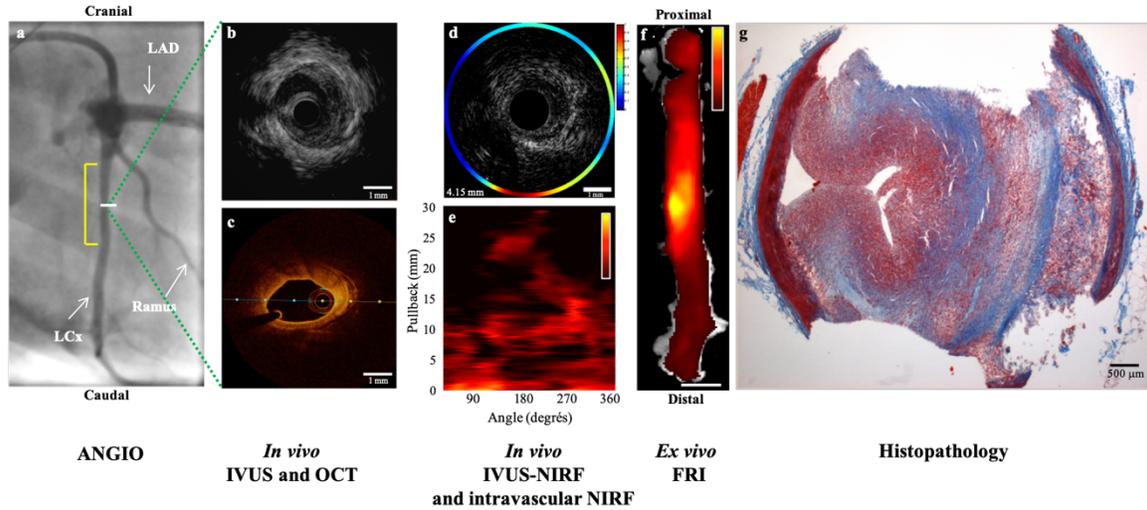
**Figure 3. *Ex vivo* FRI validation of *in vivo* NIRF in both rabbit aortas and mini-swine coronary arteries.**

Comparison of *in vivo* NIRF imaging and *ex vivo* FRI signal following local infusion of ICAM-1 probe (**A, C**) and the negative control (**B, D**) in rabbit aortas and mini-swine coronary arteries (infusion zone delineated by the yellow line). *In vivo* NIRF color scale is in arbitrary units (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). *Ex vivo* NIRF color scale displays number of counts according to signal intensity (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). Scale bar: 10 mm (**A, B**); 5 mm (**C, D**). Data are presented as mean  $\pm$  standard of the mean (SEM).



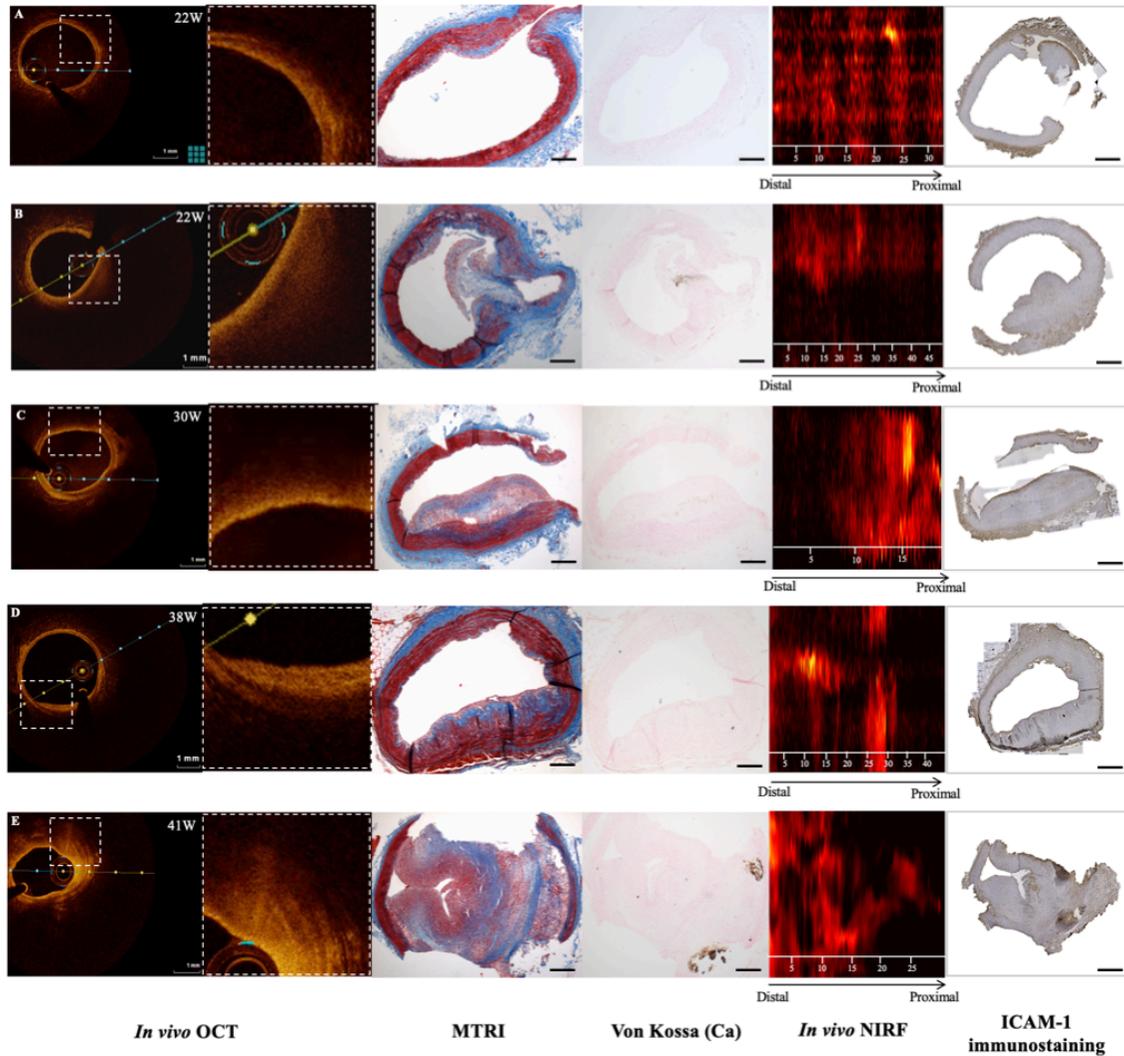
**Figure 4. NIRF imaging of anti-ICAM-1 sdAb in rabbit abdominal aortas.**

(A) Conventional angiography of the abdominal aorta, whereas the injured zone is delineated by the yellow line; (B) *En face* image of the diseased aorta in white light showing atheroma plaque comprised in the deendothelialized area, corresponding to strong fluorescent signal detected by *in vivo* NIRF and *ex vivo* FRI (C-E); *In vivo* IVUS-NIRF imaging performed after *in situ* imaging tracer delivery; (F) IVUS cross-sections images of the aorta at two distinct pullback distances from the aorto-iliac bifurcation (8.6 mm and 20 mm, respectively), with NIRF signal intensity displayed on outer color spectrum (orange/red); Inflamed lipid-rich plaques visualized by histopathology staining of the distal abdominal aorta following Masson's trichrome (MTRI) and Oil-red-O (ORO) staining (G, H); and (I) macrophages immunohistochemical staining (RAM-11, anti-rabbit macrophages, 40X magnification). *In vivo* NIRF color scale is in arbitrary units (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). *Ex vivo* NIRF color scale displays number of counts according to signal intensity (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). Scale bar: 10 mm.



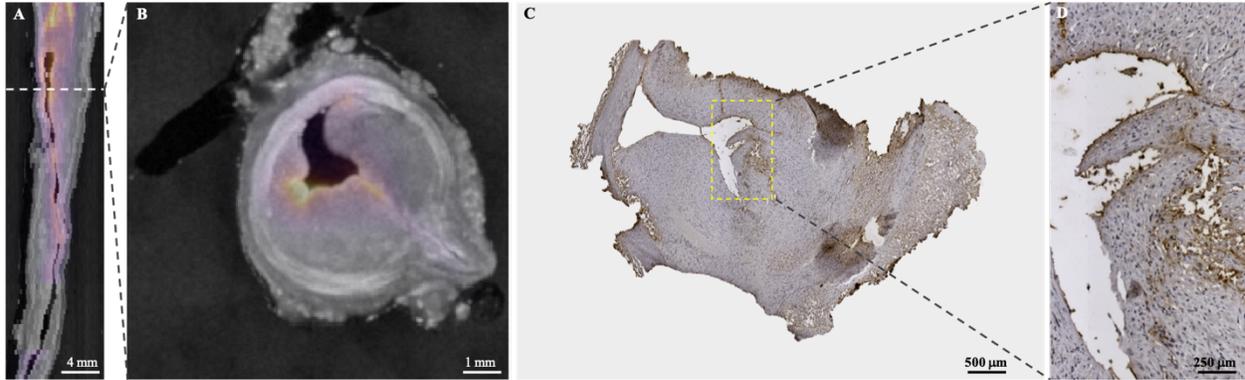
**Figure 5. Colocalization of NIRF imaging of ICAM-1 in mini-swine coronary arteries.**

(A) Baseline coronary angiogram of the left coronary artery; (B, C) Lipid-rich plaque visualized by IVUS and OCT within the infusion area (delineated by the yellow line) of the left circumflex (LCx) coronary artery (white line, colocalization with angiogram); (D, E) *In vivo* NIRF signal following local infusion of anti-ICAM-1 sdAb in the diseased segment; (F) *Ex vivo* FRI of anti-ICAM-1 binding in the coronary artery; (G) Masson's trichrome (MTRI) coloration shows a stenotic fibrotic lesion with high-density of collagen. *In vivo* NIRF color scale is in arbitrary units (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). *Ex vivo* NIRF color scale displays number of counts according to signal intensity (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). Scale bar: 5 mm



**Figure 6. *In vivo* NIRF signal and ICAM-1 quantification following plaque evolution in mini-swine coronary arteries.**

Development of eccentric lipid-laden lesions observed by OCT (left panels) from 22 to 41 weeks (A-E); middle panels represents collagen staining with Masson's trichrome (MTRI) and calcium staining with Von Kossa (images at 4X magnification, scale bar: 500  $\mu$ m); right panels shows *in vivo* NIRF pullbacks following anti-ICAM-1 sdAb probe infusion, with correlative immunostaining of ICAM-1 of mini-swine coronary artery sections (images at 20X magnification, scale bar: 1 mm). *In vivo* NIRF color scale is in arbitrary units (yellow/white: higher NIRF signal intensity; red: lower NIRF signal intensity). Ca, calcium; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; NIRF, near-infrared fluorescence; OCT, optical coherence tomography.



**Figure 7. 3D histology validation of *in vivo* NIRF signal in coronary arteries of diabetic mini-swine.**

*Ex vivo* optical coherence tomography (OCT) and confocal reconstruction of a diseased coronary artery. (A) 3D reconstruction of the coronary artery with colocalization of the corresponding cross-sectional image (B) after Beer-Lambert corrections, contrast adjustments, and deconvolution (Log-scale), with superimposed fluorescence signal (pink-yellow); (C) Histology slice with antibody ICAM-1 immunostaining at 4X magnification and; (D) at 20X magnification showing ICAM-1 staining at the surface of the arterial wall.

## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

## Supplemental methods

### **Animal models - Swine model.**

- **Glycemic control.** At baseline, fasting glucose levels were maintained below 7.0 mmol/L. While transitioning to a high-fat diet, capillary blood glucose was measured twice daily for 3 consecutive weeks to allow for subcutaneous intermediate-acting (NPH) insulin dosage adjustments (Humulin® NPH, Eli Lilly, Indiana, USA) in order to maintain glucose levels between 17.0-25.0 mmol/L. Thereafter, blood glucose was monitored weekly or in presence of behavior changes. One animal did not require insulin therapy throughout the study, with mean fasting glucose levels of 6.9 and 22.9 mmol/L at baseline and sacrifice, respectively.
- **Biological profile** (Table 1). Monthly fasting blood samples were obtained through a permanent venous vascular port to assess the plasma lipid profile (total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), non-HDL and triglycerides), glucose, complete blood count, liver and renal function. Endogenous insulin levels were also assessed at baseline in all animals. Body weight was monitored on a weekly basis, and mean weight gain from baseline to 22 weeks was 84% (Supplementary Figure 3).

### ***In vivo* intravascular ultrasound (IVUS) - near-infrared fluorescence (NIRF) imaging**

**Rabbits.** Accurate porous-balloon catheter sizing (balloon/artery ratio of 1.1 to 1.2:1) was determined by the minimal lumen diameter (MLD) of the abdominal aorta measured on an end-diastolic frame by quantitative coronary analysis (QCA; Syngo software, ARTIS Siemens, Germany). Rabbits were randomly allocated to receive a single injection of the probe targeting ICAM-1 (n=10) or the negative control (n=6) infused at the injury site of the distal abdominal aorta. Immediately after the injection, *in vivo* IVUS-NIRF imaging of the distal abdominal aorta was performed every 10 minutes over a 40-minute period using a custom IVUS-NIRF catheter described in previous publications [1]. A total of 5 serial pullbacks were therefore acquired in the same arterial segment for each rabbit, with the aorto-iliac bifurcation representing the distal anatomic landmark of the 50-mm length pullback. At the end of the experiment, animals were sacrificed and the aorta was resected.

**Swine.** All animals fasted 18 hours prior to the procedure and received a loading dose of both aspirin (320 mg) and clopidogrel (600 mg) the day before the catheterization. A maintenance dose of clopidogrel (75 mg) was also given the morning of the procedure. Under general anesthesia (induction with telazol 6 mg/kg intramuscular (IM) (Zoetis, Madison, USA) and inhaled isoflurane 0.5-1.5% (4% v/v, Baxter, Deerfield, IL, USA)), two 6-F sheath catheters were used to cannulate both the right femoral artery and vein. Prior to coronary artery angiography, lidocaine (bolus 2-4 mg/kg intravenous (IV)) was administered to avoid ventricular arrhythmias, as well as unfractionated heparin (300 U/kg), with an activated clotting time (ACT) measurement every 45 minutes to prevent coronary artery and/or catheter thrombosis.

Baseline coronary angiography (Siemens, Germany) was performed using an 8-F Amplatz right (AR) 2.0 guiding catheter (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) to cannulate the left coronary artery and an 8-F Judkins right (JR) 3.0 guiding catheter (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) to cannulate the right coronary artery. *In vivo* IVUS (Revolution<sup>®</sup> 45 MHz catheter, 50-mm pullback, Philips Healthcare, USA) and intravascular OCT (Dragonfly<sup>™</sup> catheter, 54-mm pullback, Abbott Vascular, IL, USA) imaging were performed to assess all three epicardial coronary arteries (right coronary artery (RCA), left main and left anterior descending artery (LAD) and left circumflex artery (LCx)), when feasible, prior to IVUS-NIRF imaging. Side branches and pullback lengths were used as landmarks for image co-registration with the coronary angiogram. Accurate porous-balloon catheter sizing and *in situ* molecular probe injection were performed according to same protocol used for rabbits. Following imaging tracer delivery, the bimodal IVUS-NIRF intravascular imaging catheter was immediately inserted over a 0.014-inch guidewire and *in vivo* imaging of the proximal coronary artery segment was acquired over 30 to 50 mm length pullback. At the end of the experiment, animals were sacrificed and the coronary arteries were resected.

### ***In vivo* IVUS-NIRF image analysis**

A dedicated blood attenuation algorithm was applied to all *in vivo* pullbacks generated in both animal models in order to compensate the fluorescence signal amplitude with the distance between the imaging catheter and the vessel wall [1]. *In vivo* NIRF signal values were reported as the peak

signal measured over the pullback and quantified as followed: peak NIRF signal measured beyond the 99<sup>th</sup> percentile minus the background value, defined as the signal between the 1<sup>st</sup> and 30<sup>th</sup> percentile, then divided by the background value.

### ***Ex vivo* fluorescence reflectance imaging (FRI)**

Harvested rabbit aortas were opened and manually elongated in a petri dish coated with black wax and filled with saline to perform *en face* fluorescence reflectance imaging (FRI) at 37°C using a commercial epi-illumination fluorescence imaging system (IVIS Lumina II, PerkinElmer, MA, USA). For swine, *ex vivo* FRI was performed on whole coronary arteries. The following parameters were used: Ex/Em 745 ± 20 / 800 nm ± 20 nm, excitation time of 20 seconds for rabbit aortas and 5 seconds for the swine coronary arteries. The *ex vivo* fluorescent signals were defined according to the total fluorescence intensity (intensity/cm<sup>2</sup>) of the region of interest (i.e. 20-mm injected area in the distal abdominal aorta and the proximal-mid segment of the swine coronary artery) and were analysed using a computer-based digitizing image system software (Lumina II Living Image 2.0). After each imaging session, the aorta's regions of interest (ROI; 15 mm in length) was embedded in Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and preserved at -80°C for further microscopy validation of the *ex vivo* imaging results. The coronary arteries were preserved in formaldehyde 10% for further *ex vivo* 3D histology imaging. The average tissue shrinkage was estimated to 30%, according to side branches that were used as landmarks and pullback length.

### ***Ex vivo* three-dimensional (3D) histology**

*Ex vivo* 3D histology of swine coronary arteries was performed on selected samples combining OCT and confocal fluorescence microscopy, as previously validated [23]. After sacrifice, coronary arteries were dissected and fixed in 10% formalin PBS-buffered solution. In order to image the whole blood vessel with our block-face imaging technology, the samples were placed upright in a custom-made 3D-printed mold and embedded in an agarose gel. The mold was then placed in a water tank, with the surface of the sample at the focal length of the objective of our OCT/confocal microscope. The tank was fixed to motors, allowing the sample to be moved in all directions with micrometer precision. Since the diameter of the coronaries exceeded the field of view of the microscope (2.5 x 2.5 mm), the samples had to be moved horizontally (in the X-Y plane) in order

to image a full slice. After the acquisition of a slice was completed, a vibratome cut a section from the sample (200  $\mu\text{m}$  thickness) and the Z motor placed the next slice at the focal length, using an algorithm that detected the water/tissue interface. The process was repeated automatically until the entire sample was imaged. The OCT volumes were then stitched together as a mosaic to form a full volume. Custom Python algorithms that used the overlap between the volumes and Laplace's equation to blend the edges together were utilized, as well as other algorithms to correct for Beer-Lambert's extinction. The confocal microscopy data was then superimposed to the OCT data, providing a high-resolution anatomical map of the vessel with fluorescence signal from the studied molecular tracer.

## **Immunohistochemical studies**

**Rabbit's abdominal aortas.** Cryosections (10  $\mu\text{m}$  thickness) of rabbit aortas comprised in the region of interest were fixed for 10 minutes in formalin at  $-20^{\circ}\text{C}$ , followed by a citrate antigen retrieval. An endogenous peroxidase activity was quenched in a solution of 3% hydrogen peroxide. Nonspecific binding of primary antibodies was prevented by preincubating the tissues with 10% serum from the species used to raise the secondary antibodies and 0.1% of Triton. Coronary sections were then exposed to primary antibody mouse anti-RAM-11 (DAKO Corp., 1:100) overnight, at  $4^{\circ}\text{C}$  followed by incubation with biotinylated goat anti-mouse (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA; 1:400). The peroxidase labeling was achieved using an avidin/biotin complex (ABC kit; Vector) and antibody visualization was established after an exposure to 3,3-diaminobenzidine solution (DAB kit; Vector). Coronaries were counterstained by Mayer's hematoxylin and then mounted with a permount solution (Fisher Scientific, Hampton NH, USA). Images were collected using a brightfield microscope and acquired under 10X magnification of each stained section. Tissue quantification of RAM-11 was performed by dividing RAM-11 area ( $\text{mm}^2$ ) stained with primary antibody with total area of both the neointima and media ( $\text{mm}^2$ ) and represented as a total percentage.

**Mini-swine's coronary arteries.** The harvested coronary artery slices (200  $\mu\text{m}$  thickness) were recovered from the vibratome in the corresponding order of the architecture of the artery sections for histopathology and immunohistochemical stainings. Excesses of agarose gel were removed manually, and tissue sections were fixed in 10% formalin PBS-buffered solution for standard

histological procedures. The samples were cut into 6- $\mu$ m sections and deparaffinized in xylene and ethanol baths, and endogenous peroxidase activity was quenched in a solution of 30% hydrogen peroxide. Nonspecific binding of primary antibodies was prevented by preincubating the tissues with 10% serum from the species used to raise the secondary antibodies. Coronary sections were then exposed to primary antibody goat anti-ICAM-1 (M-19) polyclonal antibody SC-1511 (1:500; Santa Cruz, Dallas, Tx, USA) overnight at 4°C followed by incubation with biotinylated horse anti-goat (1:400) (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). The peroxidase labeling was achieved using an avidin/biotin complex (ABC kit; Vector), and antibody visualization was established after an exposure to 3,3-diaminobenzidine solution (DAB kit; Vector). Coronary were counterstained by Mayer's hematoxylin and then mounted with a permount solution (Fisher Scientific, Hampton NH, USA). Images were collected using a brightfield microscope and acquired under 20X magnification of each stained section. Tissue quantification of ICAM-1 was performed by dividing ICAM-1 area ( $\text{mm}^2$ ) stained with primary antibody with total area of both the neointima and media ( $\text{mm}^2$ ) and represented as a total percentage.

### **Fluorescence microscopy**

Prior to *in vivo* imaging experiments, cryosections from atherosclerotic rabbit aortas, swine and human diseased coronary arteries were used to test the reactivity of the anti-ICAM-1 sdAb by *ex vivo* fluorescence microscopy. Cryostat sections of 8  $\mu$ m were obtained and incubated with 10  $\mu$ g/ml of the probe for 2 hours at room temperature. Images were taken at 20X with a confocal microscope Zeiss LSM 7 duo (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany) with filter sets for IR800CW fluorescence signal detection (excitation: 641 nm; emission: 759 nm).

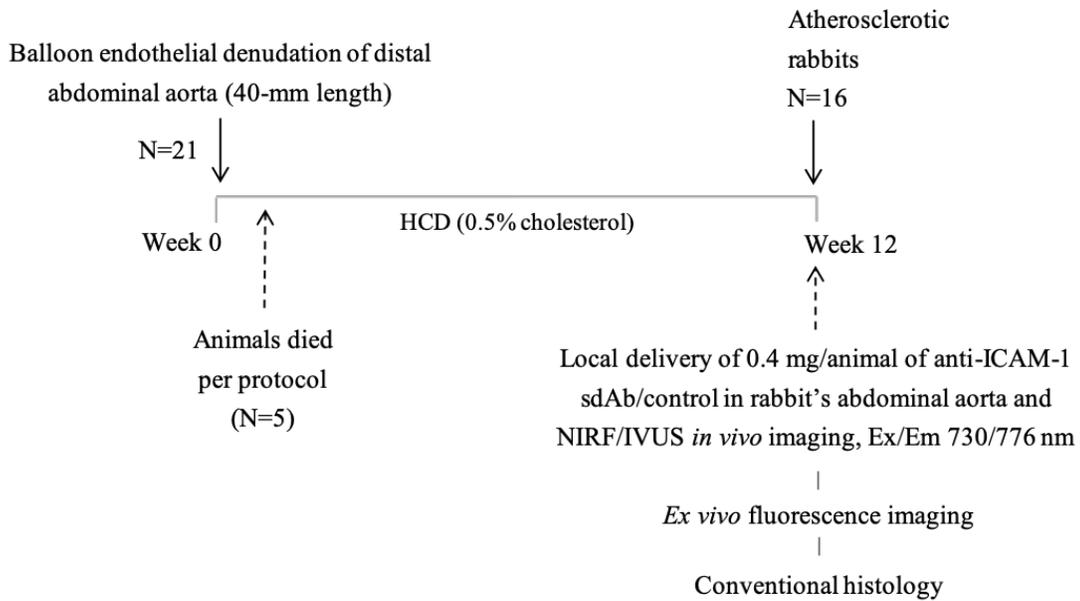
### **Histopathology**

Histopathological analyses of both aortas and coronary arteries were performed on 6- $\mu$ m tissue sections, whereas morphometry was demonstrated with Masson's trichrome staining, including collagen/fibrosis quantification (blue). Von Kossa staining was performed to identify calcium in the neointima and media (brown), and Oil red O (ORO, Sigma) to identify lipid accumulation (red). Plaques were classified according to the AHA classification that reflects atherosclerosis progression [4].

## **Statistical analyses**

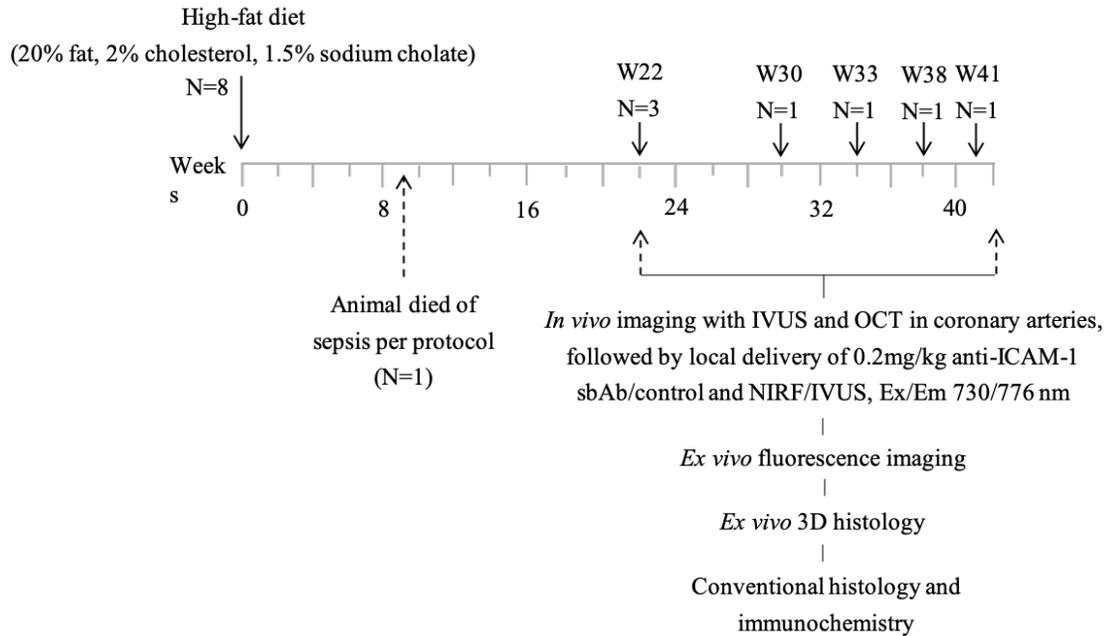
Data are presented as mean±SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed using Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A Fisher's exact test was used to compare NIRF signal detection between anti-ICAM-1 and negative control infused coronary arteries. Mann-Whitney test was used to compare both *in vivo* peak NIRF signal and *ex vivo* average total fluorescent signal between the imaging molecular probe and the control infused groups. The Pearson correlation test was used to calculate correlation coefficient between *in vivo* NIRF signal and the percentage of ICAM-1 visualized in the neointima and media. Values of  $P<0.05$  were considered statistically significant

## Supplemental figures



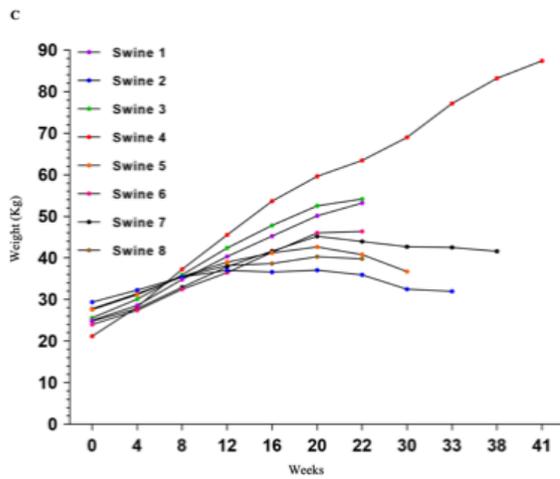
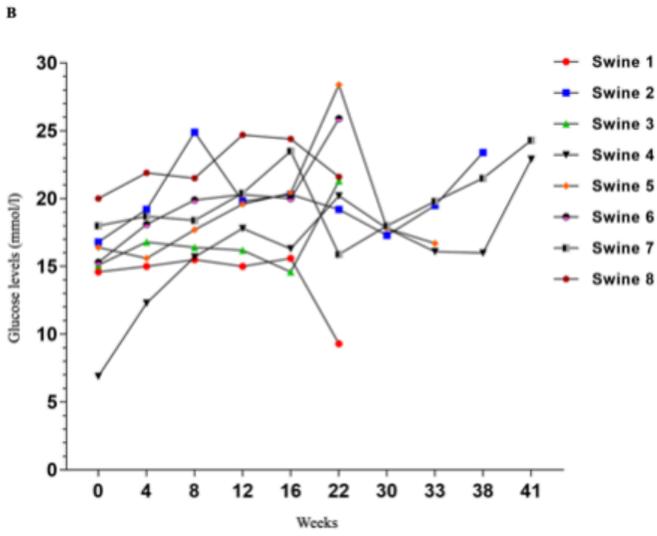
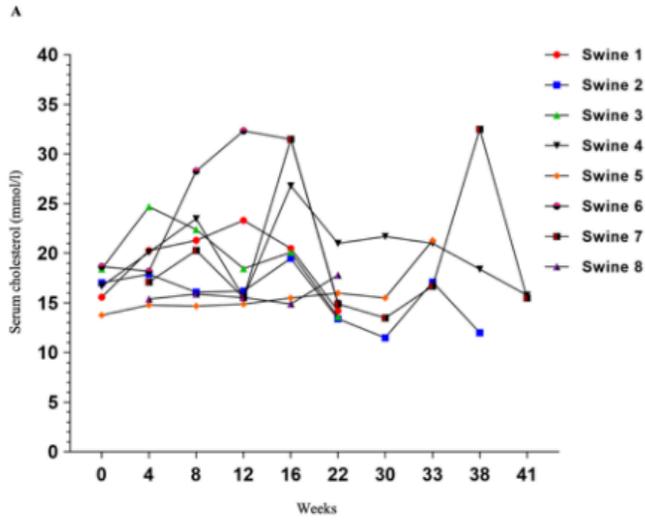
### Supplementary Figure 1. Atherosclerotic rabbit model.

Shows the study flow chart, which consisted in performing balloon denudation of the distal abdominal aorta at baseline in 21 New-Zealand White rabbits, followed by 12-consecutive weeks of hypercholesterolemic diet (HCD). Of the 21 rabbits, 16 underwent *in vivo* fluorescence imaging, which consisted in local imaging tracer delivery (anti-ICAM-1 sdAb/control) in the deendothelialized zone of the distal abdominal aorta, followed by serial *in vivo* IVUS-NIRF performed every 10 minutes over a 40-minute period (5 pullbacks/animal). *Ex vivo* fluorescence imaging and histology were performed after sacrifice. Ex, excitation; Em, emission; IVUS, intravascular ultrasound; NIRF, near-infrared fluorescence.



### Supplementary Figure 2. Diabetic and hypercholesterolemic mini-swine model.

Study flow chart of 8 diabetic Yucatan mini-swine. A high-fat diet was introduced at week 0 during a minimal duration time of 22 weeks. *In vivo* imaging experiments were performed at different time points between week 22 and 41. Intracoronary imaging consisted in performing IVUS and OCT pullback, when feasible, followed by in situ delivery of either anti-ICAM-1 imaging tracer/negative control and intravascular IVUS-NIRF imaging. *Ex vivo* fluorescence imaging, 3D histology, histopathology and immunohistochemistry analyses were performed after sacrifice. Ex, excitation; Em, emission; IVUS, intravascular ultrasound; NIRF, near-infrared fluorescence; OCT, optical coherence tomography; W, week; 3D, three-dimensions.



**Supplementary Figure 3. Individual levels of serum fasting total cholesterol, fasting plasma glucose and average weight gain in diabetic and hypercholesterolemic mini-swine.** During the study period, plasma levels of fasting total cholesterol (**A**) and glucose (**B**) were measured on a monthly basis from baseline to animal sacrifice. Each animal was weighed on a weekly basis and average body weight was calculated each month (**C**). Data is presented as mean.

## Supplemental references

1. Abran M, Stähli BE, Merlet N, et al. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerosis plaque detection in rabbits. *Biomed Opt Express* 2015; 6:3989-3999.

### 3. Étude #3

#### **Validating intravascular imaging with serial optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy.**

Pier-Luc Tardif, Marie-Jeanne Bertrand, Maxime Abran, Alexandre Castonguay, Joël Lefebvre, Barbara E. Stähli, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Pascale Geoffroy, Mélanie Mecteau, David Busseuil, Feng Ni, Abedelnasser Abulrob, Éric Rhéaume, Philippe L'Allier, Jean-Claude Tardif, Frédéric Lesage.

International Journal of Molecular Sciences 2016; 17 :2110

#### Apport original et contribution des co-auteurs

À titre de co-auteur du manuscrit, la contribution de Marie-Jeanne Bertrand, second auteur, fut de réaliser les expérimentations *in vivo* par cathéter et de co-rédiger le manuscrit avec M. Pier-Luc Tardif. Monsieur Pier-Luc Tardif, conjointement avec Dr Maxime Abran, Dr Alexandre Castonguay et Dr Joël Lefebvre, ont acquis les données de l'histologie massive 3D et réalisé les reconstructions d'images. Dr Philippe L'Allier, Dr Maxime Abran, Dr Nolwenn Merlet, Mme Téodora Mihalache-Avram, Mme Pascale Geoffroy, Mme Mélanie Mecteau et Dr David Busseuil ont également réalisé les expérimentations par cathéter. Dr Feng Ni et Dr Abedelnasser Abulrob ont développé les sondes d'imagerie moléculaires. Dr Éric Rhéaume et Mme Téodora Mihalache-Avram ont réalisé les validations histologiques des sondes moléculaires. Dr Philippe L'Allier, Dr Barbara E Stähli et Dr Frédéric Lesage ont également participé à la rédaction du manuscrit. L'étude fut supervisée par les Dr Philippe L'Allier, Dr Jean-Claude Tardif et Dr Frédéric Lesage.

# VALIDATING INTRAVASCULAR IMAGING WITH SERIAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPY

Pier-Luc Tardif<sup>1,2,\*</sup>, Marie-Jeanne Bertrand<sup>2,3</sup>, Maxime Abran<sup>1,2</sup>, Alexandre Castonguay<sup>1</sup>, Joël Lefebvre<sup>1</sup>, Barbara E. Stähli<sup>2</sup>, Nolwenn Merlet<sup>2</sup>, Teodora Mihalache-Avram<sup>2</sup>, Pascale Geoffroy<sup>2</sup>, Mélanie Mecteau<sup>2</sup>, David Busseuil<sup>2</sup>, Feng Ni<sup>4</sup>, Abedelnasser Abulrob<sup>4</sup>, Éric Rhéaume<sup>2,3</sup>, Philippe L'Allier<sup>2,3</sup>, Jean-Claude Tardif<sup>2,3</sup> and Frédéric Lesage<sup>1,2,\*</sup>

1 Département de Génie Électrique et Institut de Génie Biomédical, École Polytechnique de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

2 Montreal Heart Institute, Montreal, QC H1T 1C8, Canada

3 Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

4 National Research Council Canada (NRCC), Montreal, QC H3A 1A3, Canada

Academic Editors: Michael Henein and Joseph V. Moxon

Received: 31 August 2016

Accepted: 9 December 2016

Published: 15 December 2016

## ABSTRACT

Atherosclerotic cardiovascular diseases are characterized by the formation of a plaque in the arterial wall. Intravascular ultrasound (IVUS) provides high-resolution images allowing delineation of atherosclerotic plaques. When combined with near infrared fluorescence (NIRF), the plaque can also be studied at a molecular level with a large variety of biomarkers. In this work, we present a system enabling automated volumetric histology imaging of excised aortas that can spatially correlate results with combined IVUS/NIRF imaging of lipid-rich atheroma in cholesterol-fed rabbits. Pullbacks in the rabbit aortas were performed with a dual modality IVUS/NIRF catheter developed by our group. Ex vivo three-dimensional (3D) histology was performed combining optical coherence tomography (OCT) and confocal fluorescence microscopy, providing high-resolution anatomical and molecular information, respectively, to validate in vivo findings. The microscope was combined with a serial slicer allowing for the imaging of the whole vessel automatically. Colocalization of in vivo and ex vivo results is demonstrated. Slices can then be recovered to be tested in conventional histology. Keywords: intravascular ultrasound (IVUS); near-infrared fluorescence (NIRF); atherosclerosis; ex vivo three-dimensional (3D) histology; optical coherence tomography (OCT); confocal fluorescence microscopy

## INTRODUCTION

Atherosclerosis is a chronic immune-mediated inflammatory disease that arises from a series of complex events triggered by endothelial dysfunction, lipid accumulation in the arterial wall, and infiltration of monocyte-derived macrophages [1,2]. Acute coronary syndromes (ACS) occur mostly from the rupture of modestly stenotic lipid-rich “vulnerable” plaques, which leads to endoluminal thrombus formation, myocardial ischemia, and sudden cardiac death [3,4]. Although coronary angiography remains the gold standard for epicardial coronary stenoses assessment and treatment, it frequently underestimates true plaque burden and provides no information regarding plaque composition [5]. Intravascular ultrasound (IVUS) imaging has been established as an adjunct imaging technology to coronary angiography, widely used in both clinical and research applications [6]. By generating in vivo cross-sectional images of the vessel wall and lumen, IVUS enables the characterization of atherosclerotic vessel segments by providing accurate lumen and vessel dimensions, as well as non-protruding plaques, positive vascular remodeling, and plaque burden assessment [7,8]. Conventional grayscale IVUS is, however, limited with regards to the analysis of plaque composition [9], whereas emerging molecular imaging technologies, such as fluorescence imaging, have been developed to overcome these limitations. Multimodality imaging systems, such as the dual-modality IVUS/near-infrared fluorescence (NIRF) imaging catheter previously engineered by our group and others [10,11,12,13], were designed for integrated microstructural and molecular plaque imaging, thus enabling a more detailed plaque characterization. The use of molecular probes in conjunction with fluorescence imaging has been shown to provide complementary information with regards to plaque activity and inflammation [14,15,16,17,18,19]. Translation of molecular imaging results to clinical applications, however, requires validation; and despite impressive advances in intravascular imaging over the past decade, histology remains the gold standard for determining plaque composition and geometry. Although providing high-resolution cross-sectional images of the arterial wall, histology remains limited to the number of tissue sections analyzed and by the lack of anatomical context; thus resulting in missed valuable data. When comparing in vivo intravascular imaging applications with histology, colocalization is often

challenged by geometric distortions and tissue shrinkage, as well as the lack of anatomical landmarks and the limited resolution of IVUS imaging.

OCT-based block-face three-dimensional (3D) histology combined with serial cutting of tissues has been proven in the past to be an efficient technique to reconstruct and visualize whole intact organs or tissues [20,21]. Previous work has demonstrated the use of serial OCT imaging primarily for brain imaging. However, this method has so far never been used for cardiovascular imaging. From the spatial resolution of optical coherence tomography (OCT), largely superior to IVUS [6], and the capacity of confocal fluorescence microscopy to efficiently identify the same molecular biomarkers as NIRF imaging [22], we developed a novel *ex vivo* automated 3D histology platform comprising a dual-modality imaging system based on OCT-coupled fluorescence sensitive confocal microscopy [21]. In this work we detail the process of image reconstruction using this system and, for the first time, describe its use for the purpose of atherosclerosis detection and localization in iliac arteries and aortas of an atherosclerotic rabbit model. Fluorescent signal colocalization obtained from *in vivo* and *ex vivo* imaging was performed to validate the potential of these methods to be co-registered and for OCT-combined fluorescence sensitive confocal microscopy to serve as a future histology add-on validation tool in the development of novel molecular probes.

## RESULTS

### *In Vitro Affinity of Anti-ICAM-1 Antibody*

A fluorescently labelled anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antibody was used as a marker of inflammation below. Four ICAM-1 probes were initially tested in vitro, but only one showed positive affinity with inflammation (Figure 1). Fluorescence confocal microscopy images were taken to evaluate the affinity of the anti-ICAM-1 antibody with mammalian cells. Human Umbilical Vein Cells (HUVEC) were imaged before and after being activated by Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha), which induces inflammation. Placing the fluorophore bound to the ICAM-1 antibody in the cell growth medium followed by flushing, it was observed that the signal was far more present for the TNF-alpha activated cells, suggesting that the ICAM-1 antibody does in fact have affinity with inflammation (Figure 1). Deconvolution was also performed to form a transverse image of the cell to show that the signal was localized on the cellular membrane and not in the growth medium or the cytoplasm (Figure 1C).

### *In Vivo Catheter Imaging*

Five atherosclerotic rabbits were imaged following either an in vivo targeted molecular probes injection (model 1) or an intravenous indocyanine green (ICG) (model 2) injection with a dual IVUS/NIRF imaging catheter designed by our group (Figure 2). The IVUS had a frequency of 45 MHz and the excitation wavelength of the NIRF was 780 nm. As shown in Figure 2B,C, a strong in vivo signal was obtained following injection of an ICAM-1 nanobody probe at 30.05 mm of pullback in model 1, with partial correlation with the echolucent region on IVUS imaging. Other ICAM-1 nanobodies that did not show affinity in vitro were also injected with the purpose of evaluating their targeting ability. For these, weak signals were detected by in vivo NIRF/IVUS imaging, despite the presence of plaque on IVUS. In model 2, a strong but localized signal was seen at 8.4 mm of catheter pullback correlated with IVUS imaging, with the plaque pointed by the red arrow (Figure 2E). The pulse generated by the ultrasound (US), created an artifact and a mask was applied to hide the catheter on the images up to the artifact radial position, which extended 50  $\mu$ m past the wall of the catheter. Thus, part of the mask

intersected the vessel wall (Figure 2E) in smaller vessels, but not in bigger ones (Figure 2C). A ring artifact that can be seen of Figure 2C was caused by a reflection on the sheath surrounding the catheter.

### **Serial Imaging System, Ex Vivo OCT Reconstructions and Fluorescence Alignment**

The model 1 rabbits were imaged with a 3× objective whereas the model 2 rabbit was imaged with a 10× water immersion objective. The former being designed to work in air, a chamber was built between the end of the objective and water by gluing a glass window to the aluminum lens tube. Typical results are presented in Figure 3B–D for raw, processed, and 3D reconstruction data, respectively. Fluorescence signal was higher at the surface or near the arterial wall, which suggests that the ICAM-1 nanobodies bind to lipid plaques and that these molecular probes are sources of specific signals. The processed slices can then be recovered after slicing and imaged in standard histology (Figure 3E,F), here, with Masson Trichrome (Figure 2E) and Von Kossa (Figure 3F) to detect calcification.

### **Data Reconstruction**

Due to tissue attenuation of the OCT signal and serial mosaic acquisitions, specific algorithms were developed to reconstruct full 3D volumes. A custom Python stitching and signal correction algorithm was developed, allowing complete artery reconstructions and atherosclerosis localization based on both modalities. The following steps were implemented :

- For each tissue slice, the volume position in the mosaic reference frame was estimated using microscope acquisition data;
- Volumes were then stitched for each tissue slice;
- Post processing was performed that included cropping of the field of view, identification of lumen mask and Beer-Lambert intensity correction;
- After post processing steps, slices were assembled together in order to form a longitudinal 3D volume.

Figure 4A,B show typical images after the post processing steps (masks, Beer-Lambert correction, intensity artifacts correction, and cropping) applied to an averaged OCT slice and fluorescence image, respectively. Figure 4C shows the attenuation map used for Beer-Lambert correction for a particular slice.

As previously mentioned, with an under-filled objective used in fluorescence imaging, deeper tissue slices could contaminate the signal of the imaged slice in fluorescence due to the extended point-spread function (PSF), thus, requiring a deconvolution algorithm to generate precise fluorescence images. A synthetic PSF was generated using the PSF generator plugin in the ImageJ software (National Institutes of Health, New York, NY, USA) using the Born and Wolf 3D optical model. It had a FWHM of 4.4  $\mu\text{m}$  in the x-y direction and of 146  $\mu\text{m}$  in the z direction and was used to correct fluorescence images.

When comparing to brain imaging obtained from a similar technology, the automatic ex vivo imaging technique required careful preparation of arterial tissues, as conjunctive tissues could cause cutting artifacts (Figure 5A), thus making it challenging to obtain uniform cuts. An algorithm was applied during image acquisitions to ensure fine control of the focal depth and to avoid placing tissues in areas where OCT had instrumental artifacts (spurious reflections) or outside the focal zone of the objective (Figure 5B,C).

### **Alignment and Tissue Deformation**

Due to ex vivo tissue fixation and a lack of intra-arterial pressure, which led to tissue dehydration and shrinkage, the comparison of in vivo and corresponding ex vivo vessel segments was challenging. Despite the average tissue shrinkage ratio of 61% that was calculated in our experiments, imaging colocalization was possible using landmarks. Longitudinal views of both IVUS and OCT anatomical imaging of an arterial segment are presented in Figure 6. The abdominal aorta and iliac arteries were visualized with both modalities, which served as reference points for colocalization. While longitudinal co-registration was possible, precise pixel-wise deformation models could not be applied since the arterial wall was highly distorted in ex vivo OCT images given the lack of blood flow in fixed tissues. Nevertheless, longitudinal

segments could be identified accurately, which enabled comparisons of pullback in vivo results to ex vivo data.

### **Validation of Intravascular Molecular Imaging**

Using the methodological steps outlined above, in vivo ICG accumulation identified with NIRF imaging was confirmed using high-resolution fluorescence confocal imaging, as shown in [Figure 7](#). Intimal thickening was also observed on ex vivo OCT, an indication of the presence of plaque. [Figure 7b](#) shows that the intimal thickness varied from 100  $\mu\text{m}$  to 200  $\mu\text{m}$  (red arrows), a difference not perceptible in IVUS, which has a resolution of about 100  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSION

Combining IVUS and fluorescence imaging (NIRF) within a single catheter may yield a reliable method that could be used to detect and locate atherosclerotic plaques in the arterial wall. This imaging method overcomes the shortcomings of coronary angiography, whereas fluorescence provides information regarding plaque composition and biology. Translation of such imaging technology to clinical applications requires robust preclinical validation, and co-registration of *in vivo* data to *ex vivo* assessments is essential for better plaque assessment. In the present work, we demonstrated that multimodal custom serial imaging of tissue sections can be used to corroborate *in vivo* findings using OCT and confocal imaging to provide high spatial resolution. Our system is also compatible with conventional histology, as the slices from the vibratome can be recovered in the correct order using a small container placed in front of the agarose block and stained using standard procedures.

The main shortcoming of conventional histology is that although it offers information on molecular tissue composition, it does not provide accurate anatomical localization of said tissues. There is, at the moment, no existing method that can reliably corroborate the *in vivo* plaque localization and composition measurements done with an intravascular catheter during pullbacks. The method described here can, however, combine the molecular composition determination aspect of conventional histology, while the 3D reconstructions allow colocalization to be performed. Furthermore, in conventional histology, images are formed after the tissue is sliced, which leads to additional deformations and difficulties in reconstructing the 3D view. With the block-face OCT technique, images are taken before slicing, facilitating 3D assembly. Our method, while not a substitute for standard histology, is projected to be a complementary method that can help to bridge *in vivo* and histological data. The ability to colocalize tissues between the *in vivo* and *ex vivo* tissues offers a novel approach that could be used to validate future intravascular molecular imaging studies. Having a reliable way to confirm the data gathered in *in vivo* scans will smooth the transition between the fundamental research and clinical domains, leading to more effective, invasive imagery techniques and eventually better treatments for patients.

### **Slicing Optimization**

One of the most challenging aspect of the ex vivo imaging process was to obtain uniform flat slices with the vibratome, as the connective tissue surrounding the artery rendered slicing more difficult. Residual connective tissue remaining above the sample after slicing appeared to block the light and/or cause inaccurate surface detection, thus, leading to some slices being imaged while being out of focus. Furthermore, slice stitching in the z-direction was very sensitive to the flatness of the slices. Keeping the slicer blade completely flat and straight at all times was difficult and resulted in different slice thicknesses. Crooked or uneven slices were problematic during reconstructions, since stitching was based on surface detection. To overcome these difficulties, a fixed overlap between slices was imposed. However, this could create gaps, which sometimes led to the presence of dark bands between slices in the longitudinal reconstruction of the aorta. It should be noted that those overlaps may also induce a small bias when approximating tissue shrinkage as the z-stitching was highly dependent on these. Finally, evaluating the shrinking factor was also made more difficult by the fact that our method relied on finding landmarks, which were sometimes sparse. Optimizing tissue embedding and a careful removal of connective tissue is, thus, key to gathering quality data.

### **Optical Optimization**

In the case of the 3× objective, the glass used to protect it from water where the sample was imaged was a source of artifacts, since a reflection and its harmonics could be seen with the OCT scanner. While adjusting the reference arm's length could minimize the effect of the glass by imaging in the opportune zones, it was never possible to fully remove its effects since the automatic imaging process, which takes a few days to perform, always yielded a few images that were not situated in the ideal zone. Since the glass has very high reflectivity, the artifact often saturated the detector and information was lost when it could be observed within the imaged tissue. It was, thus, very important for the experimenter to place the glass at a position that did not create an artifact near the focal point of the objective.

## **Big-Data Processing**

The size of the datasets acquired was a factor that rendered data analysis quite cumbersome. A raw dataset of 500 GB for a single artery section required significant computing power to process and disk space for storage. Even lowering the resolution by going from a 10× to a 3× objective, the image sizes only decreased by half. Improvement in processing in terms of efficiency and storage will be required to enable large-scale studies.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal Model for Atherosclerosis**

Six adult, male, New Zealand White rabbits (3–4 kg, 3 months old; Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) were fed a 0.5% cholesterol diet (Harlan Techlab Diets, Madison, WI, USA) to induce atherosclerosis. Two rabbit models were used: model 1 (n = 5), balloon injury performed at week 0, followed by 14-weeks cholesterol-enriched diet; model 2 (n = 1), 14-weeks of high-cholesterol diet. One rabbit did not complete the study due to neurologic complications after completion of balloon denudation. The experimental protocols were approved by the animal ethics committee of the Montreal Heart Institute Research Center (Project ID code: 2015-1827, 2015-32-02, accepted on 24 March 2015) according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### **Balloon Dilatation Procedures**

Under general anesthesia (ketamine (35 mg/kg) and buprenorphine (10 mg/kg) administered intramuscularly, inhaled isoflurane (3%v/v, Baxter, Deerfield, IL, USA) and supplemental oxygen), balloon injury of the abdominal arterial wall was performed using a 5 French (F) radial introducer catheter (Cordis Corporation, Fremont, CA, USA) introduced through the right carotid artery. Under fluoroscopic guidance (Siemens, Berlin, Germany), a 4.0 mm PTCA balloon catheter (Boston Scientific, Marlborough, MA, USA) was advanced at the iliac bifurcation over a 0.014-inch guidewire (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA), inflated with 8 atm and retracted three times in the distal 40 mm of the abdominal aorta. The right carotid artery was ligated at the end of the procedure.

### **Bimodal Near-Infrared Fluorescence (NIRF)/Intravascular Ultrasound (IVUS) Imaging Catheter System**

The in vivo imaging system ([Figure 3A](#)) used in this study, designed as an ultrasound-optical imaging catheter linked to an optical assembly and custom-made electronics, was previously described in [10]. The catheter combines an optical fiber for fluorescence imaging and an

ultrasound transducer for acoustic imaging. An electronic circuit synchronizes the acquisition with two motors driving the rotating/translating catheter assembly, and raw data is transferred directly to a laptop via a universal serial bus (USB) connection at rates of up to 250 Mbps. A custom Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) user interface filters the signals and reconstructs and displays the images in real time during acquisition. Fluorescence excitation was performed using a 780 nm laser diode and emission was detected by a photomultiplier tube (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), combined with a bandpass optical filter ( $832 \pm 19$  nm). A compensation algorithm was used to adjust the fluorescence signal amplitude for blood attenuation [10].

### **In Vivo NIRF Imaging Procedure**

In vivo NIRF imaging was performed under anesthesia, as previously described, using a 5 F introducer (Cordis Corporation, Fremont, CA, USA) placed in the left carotid artery (model 1; n = 4). Four novel tentative imaging probes (nanobodies) targeting ICAM-1 receptors (National Research Council Canada, Ottawa, CA, USA), labeled with infrared dye 800CW, were injected under fluoroscopic guidance (Siemens, Germany) in the denuded segment of the abdominal aorta of model 1, followed by intravascular IVUS/NIRF imaging. Intravenous indocyanine green (ICG, 10 mg/kg) was injected in model 2 (n = 1) and intravascular imaging was performing through a right carotid artery access 40 min after dye injection. Automated imaging pullbacks were performed in the abdominal aorta of both animal models and in the right iliac artery of model 2 at a pullback speed of 0.5 mm/s and a frame rate of 10 images/s over a total length of 50 and 100 mm, respectively. After in vivo imaging procedures, the animals were sacrificed by exsanguination under anesthesia and then underwent abdominal aorta and iliac arteries resection. The samples were fixed in 4% formaldehyde and kept at 4 °C.

### **Ex Vivo Imaging System and Methods**

Prior to ex vivo imaging, the distal 40 mm of the abdominal aorta and iliac arteries were mounted in a 4% cylindrical agarose block with 0.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Ex vivo imaging was performed using a custom made automated serialized dual-modality setup for OCT

and confocal fluorescence microscopy, incorporating a swept-source laser with a central wavelength of 1310 nm and a tuning bandwidth of 100 nm for OCT. The confocal laser passed through a filter cube before being reflected at a 90° angle by a long pass dichroic mirror at 875 nm which allowed for it to be combined with the OCT laser beam ([Figure 3](#)), allowing simultaneous acquisition of OCT and confocal data. To overcome limited light penetration in the tissue and scattering from microscopic imaging, a vibratome allowed sequential sectioning of the tissue block face in order to reveal new tissue regions to image. Following a previously described design, a dual flexure part isolated vibration of the blade from a direct current (DC) motor on a one-axis yielding precise cutting of the tissue. X and Y stages allowed moving the sample relative to the objective and imaging every sub-region (1 by 1 mm). Tissue samples embedded in agarose blocks were placed underneath a 10× water immersion objective for model 2. After an entire section was imaged, a 200-µm slice of tissue was removed and the process was repeated automatically. For each slice, the Z position of the sample was adjusted in order to have the focus approximately 50 µm under the tissue surface, thus avoiding imaging of deformed tissue due to its slicing. The images from both in vivo and ex vivo systems were analyzed using Matlab. Anatomical landmarks allowed for a precise sub-millimeter colocalization of in vivo and ex vivo images, along with the calculation of the shrinkage ratio of the excised tissue. To obtain three-dimensional (3D) reconstructions, imaging data was downsampled to a voxel size of 4 µm by 4 µm by 200 µm, converted in DICOM and loaded with Osirix (Pixmeo, Geneva, Switzerland). A maximum intensity projection algorithm was applied to generate a three-dimensional view of the vessels. The ex vivo imaging system generated cross-sectional OCT image slices with a pixel size of 2 µm by 2 µm and a depth of 6.5 µm. The resulting dataset had a size of over 500 GB. In fluorescence confocal microscopy, one cross-sectional image was obtained for each 200-µm depth. Colocalization between the IVUS and OCT images was performed. [Figure 6](#) compares the OCT reconstruction with the IVUS scan for rabbit 1. Colocalization between images relied on finding biological landmarks, primarily bifurcations. Pullbacks began at the bifurcation between the left and right iliac artery and could be seen on both types of scans, providing a good starting point.

For model 1, aortas were imaged using the aforementioned OCT/confocal microscope, but with a 3× air objective and a 5 µm × 5 µm pixel size. Axial resolution was unchanged. A glass was

added between the objective and the water to create an air chamber. The field of view (FOV) in the lateral directions was set to  $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm}$ . The ICAM-1 fluorophore was sensitive to a 776 nm wavelength. The  $3\times$  objective did not allow for a high enough signal-to-noise ratio (SNR) with a small pinhole ( $100 \text{ }\mu\text{m}$ ), and an iris was used instead. This, however, came at the cost of lateral resolution ( $4.4 \text{ }\mu\text{m}$ ). The vibratome blade was inclined at an approximately 20-degree angle with the plane of the agarose gel. Connective tissue was removed before embedding the aorta in agarose with a razor blade. Three-dimensional reconstructions of the aortas were done using custom Python algorithms developed for this purpose. Since an iris was used instead of a pinhole, deconvolution was performed on the fluorescence images in order to locate more accurately the sources of signal.

For OCT images, the first reconstruction step was to find the volumes position within the mosaic reference frame. A displacement model of the sample-motorized stage was used to estimate each XY tile position within the mosaic. The model parameters were estimated from the data by computing the phase-correlation based pairwise registration [23] of all neighboring tiles within the mosaic and by inverting the model, solving for each parameter. The next step was to stitch together the volumes for each slice. Adjacent volumes were blended together by finding the medial axis of their 2D overlap region and by applying a small Gaussian feathering to ensure a smooth transition between tiles. Each tissue slice was stitched separately.

A few post processing steps were then applied on each slice to remove intensity artifacts, to limit the field of view to the tissue, to compute the lumen mask, and, finally, to estimate and compensate the light attenuation with depth in the OCT volumes. This last step was done by fitting a Beer-Lambert law on each A-Line and by estimating the attenuation coefficient from this fit [24]. The Beer-Lambert law was then used again with the average tissue attenuation coefficient to normalize the OCT volume and thus reduce its contrast variation with depth.

The last reconstruction step was to stitch the slices together in the z direction to get a complete 3D volume. This was done by computing the shift between adjacent slices using the cross-correlation of their 2D image gradient magnitude. Then, the slices were stitched together by solving the Laplace equation with Dirichlet boundary conditions over their masked overlap region. The tissue mask was used to remove the gaps introduced by the slice cutting artifacts.

Colocalization between the IVUS and OCT images was performed. Colocalization between images relied on finding biological landmarks, primarily vessel bifurcations. Pullbacks began at the bifurcation between the left and right iliac artery and could be seen on both types of scans for model 2, providing a good starting point. The distance between the same landmarks was measured by knowing the pixel size (6.5  $\mu\text{m}$ ) for OCT, and by comparing it to the distance found on the IVUS data, which was recorded during acquisition.

## CONCLUSIONS

In conclusion, a method for atherosclerotic plaque detection and molecular characterization has been investigated both *in vivo* and *ex vivo* in a rabbit model. The *in vivo* method relied on an intravascular catheter that combined IVUS and fluorescence imaging, while the *ex vivo* method combined an OCT and a fluorescence confocal microscope with a custom serial slicer and stitching algorithm to reconstruct whole 3D segments of aortas and locate the presence of plaque with great accuracy. Colocalization between the *in vivo* and *ex vivo* data was performed by finding landmarks between the IVUS and OCT volumes. This massive histology method is a promising approach to validating future intravascular catheters; it could potentially become a new gold standard to validate intravascular molecular imaging, and it is a great addition to the currently used histology methods.

**Acknowledgments:** This study was supported by CIHR operating grant 273578 to F. Lesage.

**Author Contributions:** Pier-Luc Tardif, Maxime Abran, Alexandre Castonguay, and Joël Lefebvre acquired the 3D histology data and performed image reconstruction; Philippe L'Allier, Marie-Jeanne Bertrand, Maxime Abran, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Pascale Geoffroy, Mélanie Mecteau, and David Busseuil performed the catheter experiments; Feng Ni and Abedelnasser Abulrob synthesized the molecular probes; Éric Rhéaume and Teodora Mihalache-Avram performed histological validations; Philippe L'Allier, Marie-Jeanne Bertrand, and Frédéric Lesage wrote the article; Philippe L'Allier, Jean-Claude Tardif, and Frédéric Lesage designed and supervised the study.

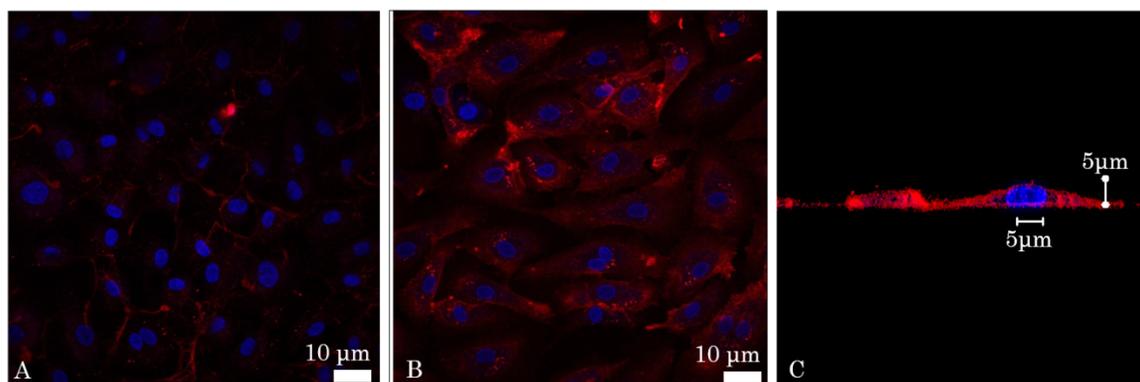
**Conflicts of Interest:** authors declare no conflict of interest

## REFERENCES

1. Libby, P.; Okamoto, Y.; Rocha, V.Z.; Folco, E. Inflammation in atherosclerosis transition from theory to practice. *Circ. J.* **2010**, *74*, 213–220.
2. Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **2011**, *473*, 317–325.
3. Bentzon, J.F.; Otsuka, F.; Virmani, R.; Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1852–1866.
4. Muller, J.E.; Tofler, G.H.; Stone, P.H. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* **1989**, *79*, 733–743.
5. Mintz, G.S.; Painter, J.A.; Pichard, A.D.; Kent, K.M.; Satler, L.F.; Popma, J.J.; Chuang, Y.C.; Bucher, T.A.; Sokolowicz, L.E.; Leon, M.B. Atherosclerosis in angiographically “normal” coronary artery reference segments: An intravascular ultrasound study with clinical correlations. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1995**, *25*, 1479–1485.
6. Tardif, J.C.; Lesage, F.; Harel, F.; Romeo, P.; Pressacco, J. Imaging biomarkers in atherosclerosis trials. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2011**, *4*, 319–333.
7. Berry, C.L.; L’Allier, P.; Grégoire, J.; Lespérance, J.; Lévesque, S.; Ibrahim, R.; Tardif, J.C. Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression. *Circulation* **2007**, *115*, 1851–1857.
8. Mintz, G.S.; Garcia-Garcia, H.M.; Nicholls, S.J.; Weissman, N.J.; Bruining, N.; Crowe, T.; Tardif, J.C.; Serruys, P.W. Clinical experts consensus document on standards of acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound regression/progression studies. *EuroIntervention* **2011**, *6*, 1123–1130.
9. Sanchez, O.D.; Sakakura, K.; Otsuka, F.; Yahagi, K.; Virmani, R.; Joner, M. Expectations and limitations in contemporary intravascular imaging: Lessons learned from pathology. *Expert Rev Cardiovasc. Ther.* **2014**, *12*, 601–611.
10. Abran, M.; Cloutier, G.; Cardinal, M.H.R.; Chayer, B.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Development of a photoacoustic ultrasound and fluorescence imaging catheter for the study of atherosclerotic plaque. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **2014**, *8*, 696–703.

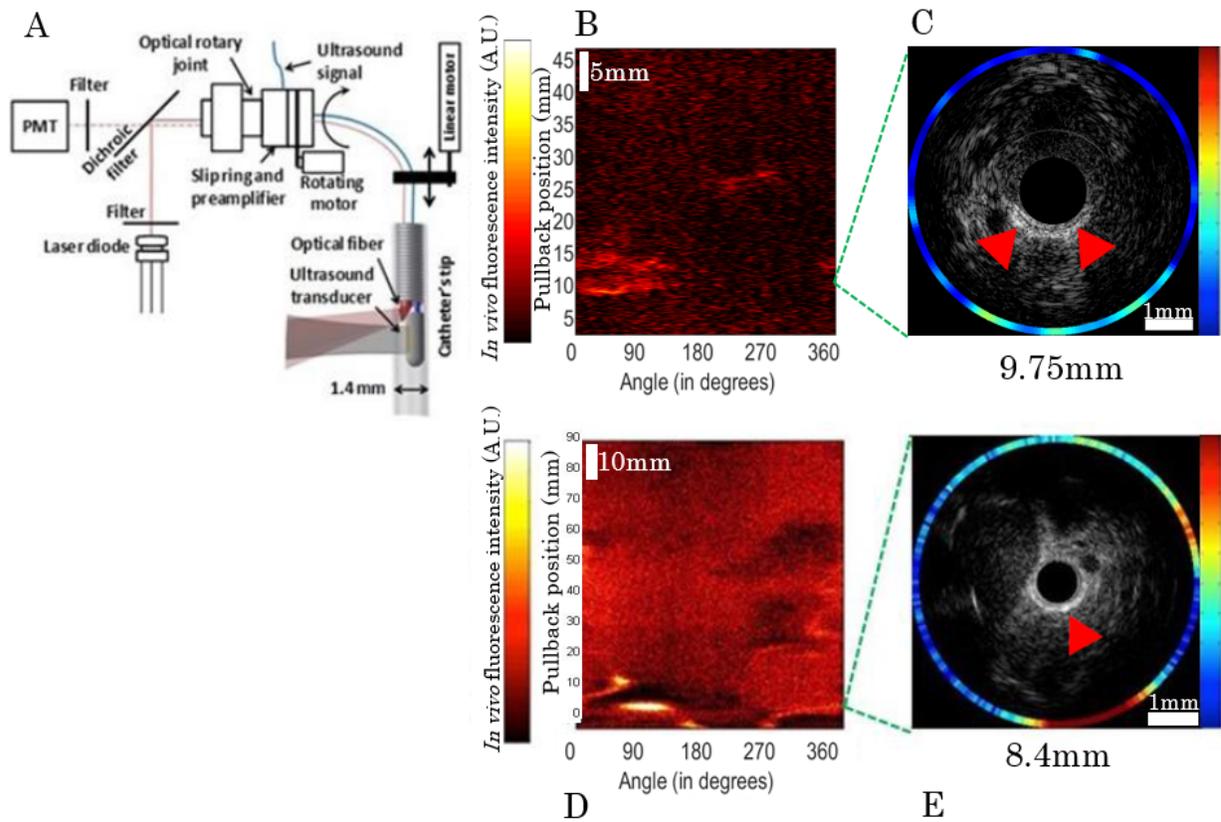
11. Dixon, A.J.; Hossack, J. Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, doi:10.1117/1.JBO.18.5.056009.
12. Mallas, G.; Brooks, D.H.; Rosenthal, A.; Nudelman, R.N.; Mausekapp, A.; Jaffer, F.A.; Ntziachristos, V. Improving quantification of intravascular fluorescence imaging using structural information. *Phys. Med. Biol.* **2012**, *57*, 6395–6406.
13. Bec, J.; Xie, H.; Yankelevich, D.R.; Zhou, F.; Sun, Y.; Ghata, N.; Aldredge, R.; Marcu, L. Design construction and validation of a rotary multifunctional intravascular diagnostic catheter combining multispectral fluorescence lifetime imaging and intravascular ultrasound. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *4*, 319–333.
14. Jaffer, F.A.; Calfon, M.A.; Rosenthal, A.; Mallas, G.; Razansky, R.N.; Mausekapp, A.; Weissleder, R.; Libby, P.; Ntziachristos, V. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 2516–2526.
15. Jaffer, F.A.; Vinegoni, C.; John, M.C.; Aikawa, E.; Gold, H.K.; Finn, A.V.; Ntziachristos, V.; Libby, P.; Weissleder, R. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation* **2008**, *118*, 1802–1809.
16. Nahrendorf, M.; Jaffer, F.A.; Kelly, K.A.; Sosnovik, D.E.; Aikawa, E.; Libby, P.; Weissleder, R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation* **2006**, *114*, 1504–1511.
17. Rouleau, L.; Berti, R.; Ng, V.W.K.; Matteau-Pelletier, C.; Lam, T.; Saboural, P.; Kakkar, A.K.; Lesage, F.; Rhéaume, E.; Tardif, J.C. VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Med. Mol. Imaging* **2013**, *8*, 27–39.
18. De Vries, B.M.W.; Hillebrands, J.; van Dam, G.M.; Tio, R.A.; de Jong, J.S.; Slart, R.H.J.A.; Zeebregts, C.J. Images in cardiovascular medicine. Multispectral near-infrared fluorescence molecular imaging of matrix metalloproteinases in a human carotid plaque using a matrix-degrading metalloproteinase-sensitive activatable fluorescent probe. *Circulation* **2009**, *119*, e534–e536.

19. Abran, M.; Stähli, B.E.; Merlet, N.; Mihalache-Avram, T.; Mecteau, M.; Rhéaume, E.; Busseuil, D.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits. *Biomed Opt Express* **2015**, *6*, 3989–3999.
20. Wang, H.; Zhu, J.; Akkin, T. Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *NeuroImage* **2014**, *84*, 1007–1017.
21. Castonguay, A.; Avti, P.K.; Moeini, M.; Pouliot, P.; Tabatabaei, M.S.; Bélanger, S.; Lesage, F. Investigating the correlation between white matter and microvasculature in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. *Proc. SPIE* **2015**, *9328*, doi:10.1117/12.2077830.
22. Pande, A.N.; Kohler, R.H.; Aikawa, E.; Weissleder, R.; Jaffer, F.A. Detection of macrophage activity in atherosclerosis in vivo using multichannel, high-resolution laser scanning fluorescence microscopy. *J Biomed Opt.* **2006**, *11*, doi:10.1117/1.2186337.
23. Preibisch, S.; Saalfeld, S. Fast stitching of large 3d biological datasets. In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> ImageJ User and Developer Conference, Luxembourg, 7–8 November 2008.
24. Faber, D.; van der Meer, F.; Aalders, M.; van Leeuwen, T. Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography. *Opt. Express* **2004**, *12*, 4353–4365.



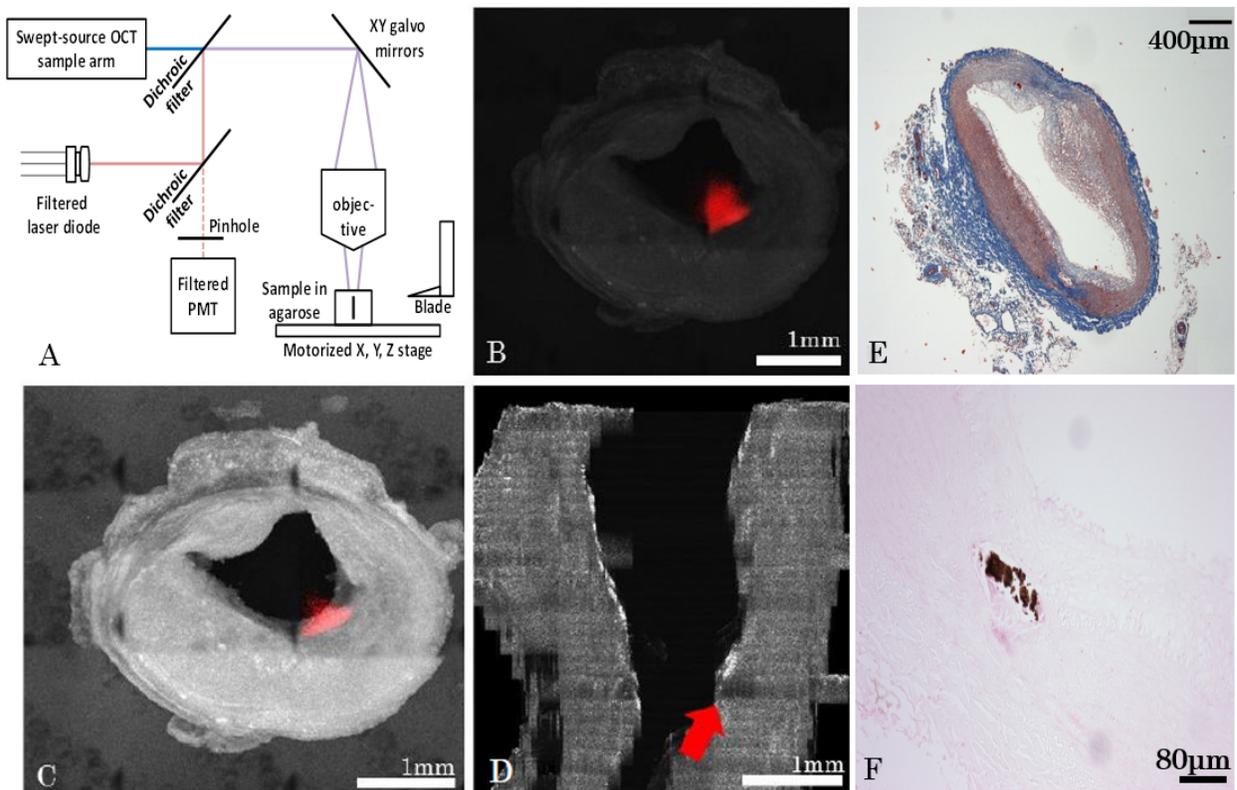
**Figure 1. Fluorescent confocal images of in vitro affinity of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antibody (A) Inactivated and (B) Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) activated Human Umbilical Vein Cells (HUVEC).**

The nuclei (blue) were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) © deconvolved image of a cell. The fluorescence signal (red) is not present in the cytoplasm or the nucleus, but is, rather, located on the cell membrane.



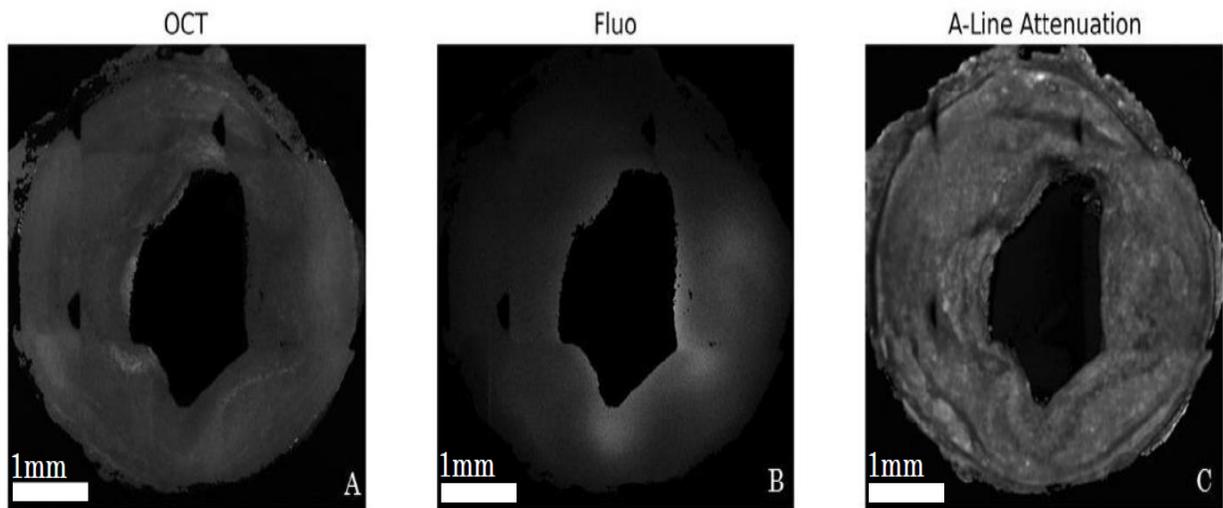
**Figure 2. In vivo imaging system and typical images.**

(3) Overview of the bimodal catheter system with a detailed view of the catheter's tip. PMT stands for photomultiplier tube; (B) Paired in vivo near-infrared fluorescence signal detected over 360 degrees with 50 mm pullback length; and (C) integrated NIRF-IVUS cross-sectional imaging with partial fluorescence signal and echolucent plaque colocalization (shown by red arrows) in model 1. Atherosclerotic plaque, shown by echolucent signal on IVUS (D,E), was partly correlated with indocyanine green (ICG)-fluorescence signal at 8.4 mm of pullback (red arrow) in model 2.

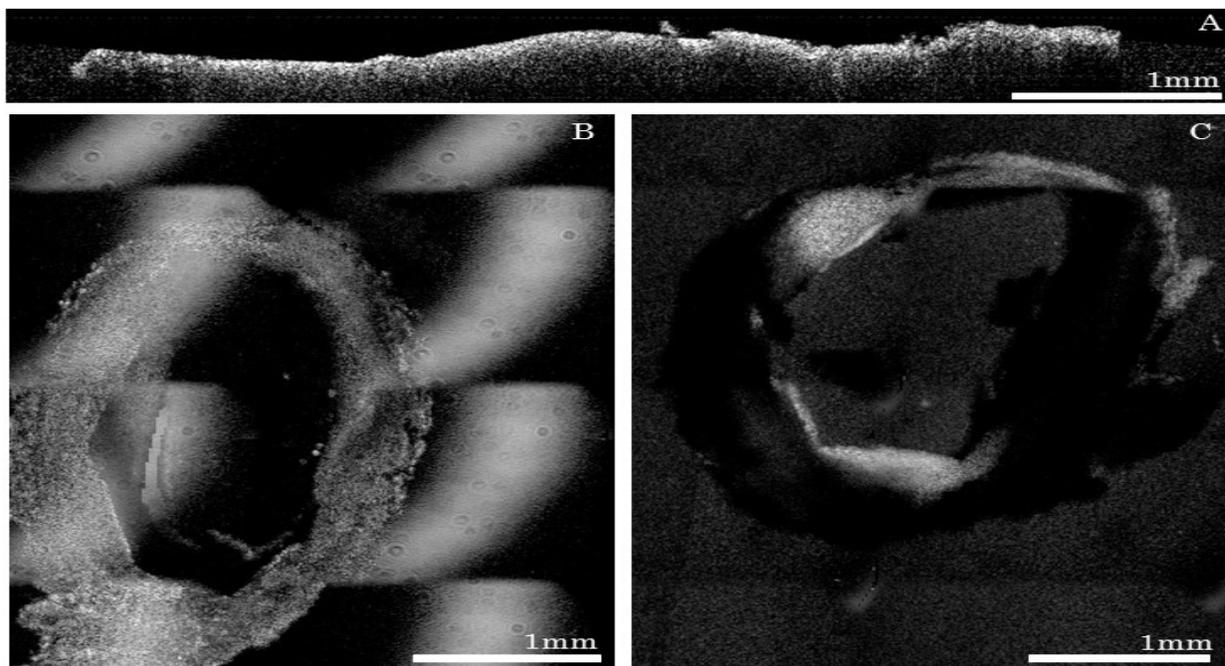


**Figure 3. Ex vivo optical coherence tomography (OCT) and confocal reconstruction for a model 1-type rabbit.**

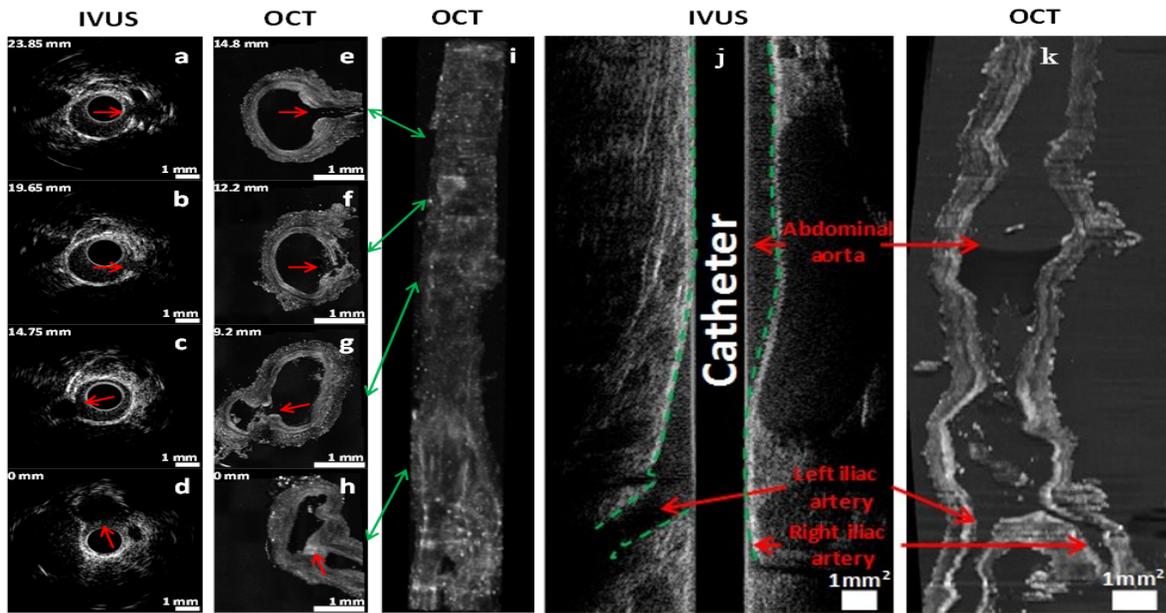
(A) Overview of the serial histology imaging system; (B) Example of an averaged slice (raw data) with the fluorescence image superimposed on it (i.e., red signal); (C) Example of the same slice after Beer-Lambert corrections, contrast adjustment, and deconvolution (Log-scale), with superimposed fluorescence image (red); (D) Localization of the tissue slice (c) on a 3D reconstruction (shown by red arrow); (E) Histology slice colored with Masson Trichrome and a 4× objective (F) Same slice imaged with VonKossa and a 20× objective.



**Figure 4.** Corrected images for model 1 rabbit for OCT (A); and fluorescence (B); A-line attenuation map used for OCT intensity correction outlines detailed tissue structures (C).

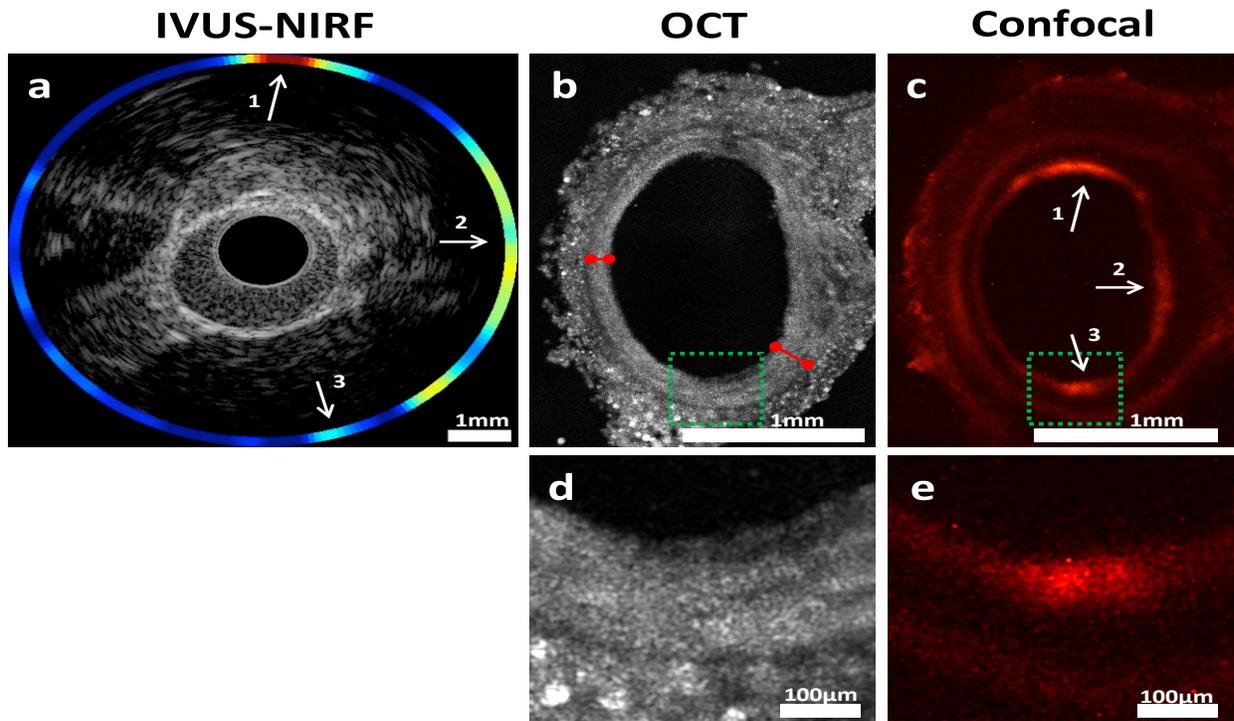


**Figure 5. Sources of imaging artifacts and their effects during acquisitions: (A)** Unevenly cut slice; **(B)** Artifact caused by the glass when the reference arm was not properly placed; **(C)** Slice that was imaged while not placed at the focal point of the lens.



**Figure 6. Intravascular ultrasound (IVUS) and OCT colocalization of anatomical landmarks in model 2.**

(a–d) In vivo IVUS cross-sectional images; (e–h) Ex vivo OCT cross-sectional images; (i) 3D reconstruction in OCT using a maximum intensity projection algorithm. Indicated numbers in mm (upper left of each image) represent the distances between the cross-section and the iliac bifurcation. The catheter was introduced in the right iliac artery, located at the bottom-right in the OCT image in (h,i). Green arrows indicate the location of the cross-section slices on 3D reconstruction. Red arrows denote side branches (anatomical landmarks) used for colocalization. Longitudinal view of the abdominal aorta and iliac arteries in IVUS and OCT imaging in model 2; (j) In vivo IVUS image of a 50 mm artery segment (green dashed lines delineates the arterial wall); (k) Ex vivo OCT image of the same segment, which shrunk to a length of 30 mm after ex vivo tissue fixation. Scale bars represent a region of 1 mm by 1 mm.



**Figure 7. Cross-sectional view of the abdominal aorta in model 2.**

**(3)** IVUS-NIRF imaging in vivo; **(b)** OCT imaging ex vivo; **(c)** Confocal fluorescence microscopy imaging ex vivo; **(d,e)** Enlarged sections of the green region of **(b,c)**. Red arrows identify the intimal thickness at two locations in the OCT image. White arrows indicate colocalization between in vivo and ex vivo fluorescence. Arrow 3 shows a weaker colocalization due to the limitation of our blood attenuation compensation algorithm [19], further supporting the need for co-registered ex vivo validation.

# DISCUSSION

La présente thèse de doctorat fut réalisée dans le but d'adresser un besoin clinique essentiel en cardiologie, soit la nécessité de développer une stratégie d'imagerie intravasculaire permettant de détecter et éventuellement traiter les plaques vulnérables avant la survenue d'événements adverses tels que l'infarctus du myocarde et la mort subite. Ce projet de recherche, présenté en 3 articles scientifiques, a permis de démontrer la faisabilité d'une technique d'imagerie moléculaire par cathéter bimodal IVUS-NIRF couplé à l'utilisation de sondes d'imagerie ciblant spécifiquement l'inflammation (ICAM-1) et la composition de la plaque d'athérosclérose (fibres de collagène type-I non polymérisées). Les résultats préliminaires contenus dans ce travail décrivent une technique d'imagerie *in vivo* novatrice et originale permettant la détection par cathéter d'un signal NIRF suivant l'injection *in situ* en faible quantité de traceurs moléculaires spécifiques au site d'une plaque d'athérome dans deux modèles animaux athérosclérotiques distincts, avec colocalisation du signal au sein de plaques visualisées par IVUS. De surcroît, nous avons démontré la précision du système d'imagerie à discriminer le signal NIRF lors d'injections simultanées des deux sondes d'imagerie couplées à des fluorophores distincts, ayant la capacité de détecter simultanément de multiples biomarqueurs (multiplexage) au sein d'une même plaque d'athérosclérose. A notre connaissance, aucune publication antérieure n'a démontré la faisabilité d'une modalité d'imagerie *in vivo* de l'athérosclérose ayant recours à l'administration locale de traceurs moléculaires d'imagerie fluorescents dans le but de visualiser simultanément l'inflammation et la composition de la plaque d'athérome au sein d'animaux vivants.

L'athérosclérose coronarienne est une maladie inflammatoire chronique insidieuse, fréquemment asymptomatique, caractérisée par l'absorption et l'accumulation de lipoprotéines dans la paroi artérielle suivant un dommage à l'endothélium vasculaire. L'infarctus du myocarde et la mort subite surviennent principalement lors de l'occlusion aiguë d'une artère coronaire par rupture d'une plaque fibroathéromateuse arborant une chape fibreuse amincie (TCFA), soit une plaque ayant un phénotype de vulnérabilité caractérisé par un centre nécrotique riche en lipides et cellules inflammatoires et séparée du compartiment sanguin par une mince coque de tissus

fibreux. Malgré une diminution importante de la mortalité et d'événements cardiovasculaires majeurs suivant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (i.e. statines, PCSK9), il subsiste un risque résiduel substantiel d'événements CV dans la population qui pourrait, en partie, découler de l'échec des traitements actuels à cibler et moduler efficacement l'inflammation. Ainsi, le développement d'un outil d'imagerie précis ayant la capacité d'identifier les plaques à haut risque de rupture est indispensable chez des patients avec MCAS afin d'optimiser la stratification du risque, de déterminer le pronostic à long terme et développer de nouvelles cibles thérapeutiques, un réel défi dans la pratique future de la cardiologie interventionnelle.

## 1. **Modèles animaux sélectionnés pour les fins de l'étude**

### 1.1. **Modèle de dénudation au ballon des lapins athérosclérotiques**

Le lapin athérosclérotique est un modèle très utilisé en recherche, est peu coûteux et de taille permettant d'effectuer des procédures endovasculaires [442]. L'induction de lésions par l'instauration d'une diète riche en cholestérol mène à une augmentation rapide et marquée des niveaux de cholestérol ( $\leq 20$  jours) et à l'apparition de plaques lipidiques, principalement dans l'arche aortique et l'aorte thoracique, en un laps de temps très court [443]. La dénudation par ballon de l'aorte abdominale distale, combinée au régime hyperlipémiant [443-446], est la méthode d'induction de lésions athéromateuses qui fut sélectionnée dans ce projet de recherche. Ainsi, nous avons pu réaliser un modèle d'athérosclérose avec un nombre substantiel d'animaux (N=21) et dans un délai assez court (12 semaines). De plus, la technique d'imagerie *in vivo* par cathéter de même que la désendothélialisation de l'aorte abdominale avaient préalablement été démontrées dans le laboratoire [293]. Toutefois, une des limitations de ce modèle est l'induction d'hépatotoxicité chez les lapins sous diète prolongée riche en gras/cholestérol pouvant ainsi augmenter le taux de mortalité en cours de protocole [444], ce qui fut observé dans le cadre de notre protocole de recherche (N=5).

## 1.2. Porcs diabétiques et hypercholestérolémiques

Plusieurs évidences suggèrent que le porc est le modèle animal optimal pour les études en athérosclérose puisqu'il possède plusieurs similarités au niveau génétique avec l'humain [447]. L'anatomie coronarienne étant quasi identique à celle des humains, il est possible d'effectuer différentes techniques d'imagerie et d'interventions invasives dans toutes les artères, incluant les artères coronaires. Toutefois, celles-ci sont plus friables et davantage susceptibles au vasospasme lors de manipulations expérimentales, ce qui complexifie fréquemment les interventions *in vivo* [447, 448]. De surcroît, le profil lipidique et le métabolisme des lipoprotéines s'apparentent à ceux des humains ; la majorité du cholestérol circulant est transporté par des particules de LDL (60% chez les porcs vs. 63% chez les humains) [449]. Un avantage majeur de ce modèle animal est qu'il développe spontanément de l'athérosclérose et de façon accéléré sous diète athérogénique, après l'induction d'un diabète de type 1 ou par dénudation endothéliale d'une artère au ballon [450, 451]. Préférentiellement situé dans l'aorte, les artères iliaques et coronaires, l'athérosclérose se développe progressivement et la distribution (régions soumises à des forces de cisaillement turbulentes ou faibles), de même que la composition (contenu en lipides, fibrinogène, cellules musculaires lisses et macrophages) [452] des plaques sont comparables à celles retrouvées chez les humains, particulièrement chez les porcs ayant atteints la maturité sexuelle ( $\geq 6$  mois de vie) [453]. La limitation majeure à l'utilisation d'un porc adulte domestique est sa grande taille et son poids corporel, limitant l'espace d'hébergement, les manipulations expérimentales et la nécessité à disposer de quantités importantes d'agents biologiques/pharmacologiques à l'étude afin d'obtenir des données probantes [447]. Le développement de porcs miniatures a permis de surmonter ces limitations par croisements entre les différentes races existantes [454].

A la lumière des modèles porcins d'athérosclérose précédemment décrits dans la littérature [455-458], nous avons sélectionné le modèle de porc miniature diabétique de race Yucatan pour les fins de notre projet de recherche. Afin que ceux-ci développent de l'athérosclérose coronarienne accélérée, les animaux furent soumis à

une diète riche en gras/cholestérol, dont les apports correspondaient à 1 kg de diète/jour avec collations ad libitum. Tel qu'attendu, l'athérosclérose coronarienne a progressé en fonction du temps, avec une grande variabilité dans la présence, localisation et morphologie des plaques entre les animaux à l'étude. Contrairement aux observations publiées par Gerrity et al. [455] et Dixon et al. [459], les porcs avaient peu de plaques dans les artères coronaires après 22 semaines consécutives de diète enrichie (N=3) et celles-ci étaient à des stades précoces, voire intermédiaire, de l'athérogenèse (stade II-III). Ce n'est qu'à partir de 30 semaines que les porcs ont développé des lésions plus complexes et de haut grade. Plusieurs facteurs pourraient expliquer les différences observées entre nos animaux et ceux précédemment décrits, dont la race à l'étude, la durée de l'état d'hyperglycémie, la toxine utilisée pour induire le diabète (streptozotocine vs. Alloxane) et le type et quantité de diète servie aux animaux. De plus, en ayant administré quotidiennement de l'insuline sous-cutanée aux porcs dans le but d'éviter le risque de survenue d'un coma hyperosmolaire et décès, il est plausible que les niveaux de glycémie sérique atteints n'étaient pas suffisamment élevés afin d'induire l'apparition de plaques d'athérome dans les artères coronaires et ce, principalement dans les premières semaines du protocole expérimental où le monitoring des valeurs de glycémie capillaire était plus rigoureux. Une étude publiée par van Ditzhuijzen et collègues [460] n'a démontré aucune différence dans le développement de l'athérosclérose précoce entre les porcs diabétiques et non diabétiques, avec l'hypothèse que l'hyperglycémie pourrait avoir un effet protecteur à des stades précoces de la maladie athérosclérotique, tel que décrit chez le lapin [461]. Bien qu'aucune corrélation n'ait été démontrée dans cette étude entre le poids corporel, les niveaux sériques de cholestérol total, la glycémie sérique, et le stade d'évolution de la plaque d'athérome, des lésions arborant des caractéristiques liées aux plaques complexes tels qu'un centre nécrotique riche en lipides et des calcifications ont été retrouvées chez des animaux dont le niveau basal d'insuline endogène était indétectable au début de l'étude (article #2).

## 2. **Biomarqueurs d'imagerie à l'étude : pourquoi cibler ICAM-1 et le collagène de type-I non polymérisé?**

Des études préalables réalisées sur de plus grandes espèces animales que le modèle murin furent limitées à l'utilisation du vert d'indocyanine (ICG) pour l'imagerie moléculaire, traceur non spécifique approuvé par la FDA, freinant ainsi l'utilisation et la validation de nouveaux agents dans des modèles animaux pathologiques ayant un phénotype similaire à la maladie athérosclérotique humaine. Le but de ces études préliminaires contenues dans la présente thèse n'était pas de sélectionner des traceurs d'imagerie ciblant spécifiquement des biomarqueurs à haut risque préalablement décrits dans la littérature, mais de démontrer la faisabilité d'une méthode d'imagerie intravasculaire exploitant des sondes moléculaires innovantes ayant généré des résultats très prometteurs dans de petits modèles animaux. Des fragments d'anticorps anti-ICAM-1 et les peptides ciblant les fibres de collagènes de type-I non polymérisées sont deux traceurs d'imagerie moléculaires ayant été développés par le Conseil national de recherches Canada (CNRC) afin de cibler spécifiquement l'inflammation de même qu'un constituant majeur de la plaque d'athérome. Bien qu'ils n'aient pas encore été validés à titre de biomarqueurs de vulnérabilité de la plaque, ICAM-1 et le collagène de type-I non polymérisé ont été utilisés pour les fins de ce projet de recherche pour plusieurs raisons :

- La molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), exprimée à la surface des cellules endothéliales, est impliquée dans la formation de la plaque d'athérosclérose de même que sa progression suivant une surexpression par des stimuli proinflammatoires. Kitawaga et collègues [159] ont démontré que les niveaux d'expression de ICAM-1 sont corrélés à la sévérité de la maladie athérosclérotique, ce qui en fait un biomarqueur attrayant pour l'imagerie moléculaire.
- Le collagène est un constituant important de la plaque, principalement le collagène interstitiel de type I et III, et est fortement responsable de la croissance / progression de la plaque. La chape fibreuse est composée principalement de collagène, ce qui confère une stabilité mécanique à la plaque d'athérome. L'un des mécanismes à l'origine de l'instabilité de la plaque est la protéolyse des fibres de collagène, de même qu'une réduction de la synthèse de collagène par apoptose des cellules musculaires lisses. Ainsi,

les plaques à haut risque ont une réduction nette de la teneur en collagène polymérisé (tissu) de même qu'une chape fibreuse amincie, compromettant ainsi l'architecture et la stabilité de la plaque. Par conséquent, la quantification du collagène au sein de plaques d'athérome est d'intérêt dans la caractérisation de la morphologie / anatomie de la plaque et pourrait permettre de discriminer entre les plaques stables et instables, en addition à l'étude de d'autres biomarqueurs de l'inflammation.

### **3. Validation de la technique d'imagerie *in vivo* IVUS-NIRF couplée à des sondes moléculaires : est-ce que cette modalité d'imagerie détecte spécifiquement les biomarqueurs ciblés?**

#### **3.1. Sensibilité et spécificité du signal NIRF *in vivo***

La sensibilité de détection du signal en fluorescence *in vivo* par le cathéter d'imagerie bimodal IVUS-NIRF utilisé dans ce projet de recherche a permis de détecter et quantifier le signal NIRF suivant l'infusion *in situ* des deux sondes moléculaires fluorescentes ciblant spécifiquement ICAM-1 et le collagène de type-I non polymérisé, avec colocalisation du signal dans les aortes abdominales de lapins présentant des plaques athéromateuses visualisées par IVUS. La spécificité du signal obtenu avec les deux traceurs d'imagerie a été confirmée par l'absence de signal NIRF à proximité de lésions lipidiques suivant l'injection des contrôles négatifs spécifiques pour chaque sonde moléculaire (article #1).

L'obtention d'un signal NIRF *in vivo* a également été démontré dans les artères coronaires de porcs diabétiques et hypercholestérolémiques avec la sonde ciblant ICAM-1 à différents temps d'évolution de la plaque d'athérosclérose (article #2). Afin d'évaluer les caractéristiques temporelles de l'inflammation dans l'athérosclérose, l'imagerie invasive par NIRF-IVUS a été réalisée à différentes périodes du protocole chez des porcs diabétiques et athérosclérotiques en ciblant spécifiquement ICAM-1. Bien que le nombre

d'animaux à l'étude soit très faible, l'intensité du signal NIRF détecté par cathéter tend à augmenter suivant le stade d'évolution de la plaque d'athérome et la durée de l'état d'hyperglycémie combiné à la diète riche en gras (article #2), ce qui en fait un modèle animal intéressant pour l'évaluation subséquente des caractéristiques spatio-temporelles de l'inflammation dans des études ultérieures. De surcroît, l'obtention de signal NIRF avec la sonde moléculaire ciblant ICAM-1 chez deux modèles animaux ayant développé des plaques précoces et plus complexes suggère que ICAM-1 est impliqué à différents stades de développement de l'athérosclérose, ce qui diffère des résultats publiés par Cybulsky et al. chez un modèle murin *ICAM-1<sup>-/-</sup>/Ldlr<sup>-/-</sup>* [160]. Plusieurs facteurs pourraient expliquer les différences observées en regard à l'implication de ICAM-1 dans le développement de l'athérosclérose, dont les variabilités dans l'initiation de l'athérosclérose et des niveaux d'expression de ICAM-1 à la surface endothéliale et des leucocytes selon l'espèce animal à l'étude et le type et durée de diète administrée aux animaux. Certaines évidences suggèrent qu'un état d'hyperglycémie aiguë et chronique induit l'activation de cellules endothéliales et la surexpression des niveaux de molécules d'adhésion telles que VLA-4 et ICAM-1 chez l'humain [461]. De plus, il fut rapporté que les niveaux de ICAM-1 solubles sont associés à la mortalité toutes causes et morbidité cardiovasculaires chez les individus atteints de diabète de type 1 avec néphropathie diabétique [462]. Les métabolites glycosylés, s'accumulant chez les patients avec état d'hyperglycémie chronique, sont associés à l'augmentation de l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et les E-sélectines en culture de cellules endothéliales humaines et à l'augmentation de l'expression des ARN messagers des molécules d'adhésion [463]. Ainsi, il est possible que le diabète de type 1 induit chez le modèle animal porcin à l'étude ait un impact direct sur les niveaux d'expression de ICAM-1 et ainsi reflète la présence de signal *in vivo* au sein de plaques d'athérome moins complexes dans les artères coronaires.

### **3.2. Validation du signal NIRF par FRI *ex vivo***

La validation subséquente du signal NIRF *in vivo* des deux traceurs d'imagerie fut réalisée par correspondance du signal en fluorescence *in vivo* et *ex vivo* (FRI) détectés

dans les aortes de lapins, de même que les artères coronaires. Des différences d'intensité du signal *in vivo* et *ex vivo* pour une même sonde d'imagerie ont été observées chez certains animaux et pourraient s'expliquer par le grand diamètre du prototype d'imagerie actuel par cathéter IVUS-NIRF relié à la fibre optique rigide, limitant ainsi la distance cathéter-paroi dans des artères de petits calibres. Malgré les limitations de la profondeur du signal NIRF, un ajustement de l'amplitude du signal en fluorescence pour corriger l'atténuation du signal par le sang fut tout de même être appliqué, ce qui pourrait expliquer les différences d'intensité du signal observées en *in vivo* et en *ex vivo* pour un traceur fluorescent donné.

### 3.3. Validation *ex vivo* du ciblage de ICAM-1

Tout d'abord, l'affinité de la sonde d'imagerie ciblant ICAM-1 a été confirmée dans des cellules de la veine ombilicale humaine (HUVEC) activées par le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) *in vitro* qui induit un état inflammatoire (article #3). Ainsi, le signal en fluorescence observé par microscopie confocale a démontré une colocalisation du signal à la surface de la membrane cellulaire, plutôt que dans le cytoplasme des cellules contenues dans le milieu de croissance. L'affinité des fragments d'anticorps anti-ICAM-1 pour son ligand a été subséquentement validée en *ex vivo* sur des coupes d'aortes de lapins hypercholestérolémiques (article #1) et d'artères coronaires de porcs diabétiques (article #2), démontrant la présence d'un signal focal avec la sonde ciblant ICAM-1 dans l'intima de l'aorte et d'une artère coronaire, par comparaison à un très faible signal observé avec le contrôle négatif spécifique.

Subséquentement, la spécificité de la sonde moléculaire à cibler ICAM-1 a été validée par immunohistochimie, démontrant une colocalisation du signal NIRF de forte intensité en microscopie confocale de l'anticorps anti-ICAM-1 avec un anticorps monoclonal anti-lapin ICAM-1 de souris (courtoisie du Pr Miron Cybulsky de l'Université de Toronto) à la surface de cellules endothéliales de la zone dénudée au ballon des aortes de lapins athérosclérotiques (article #1), de même qu'avec un anticorps

monoclonal de chèvre anti-ICAM-1 commercialisé dans la néointima de plaques d'artères coronaires de porcs diabétiques et hypercholestérolémiques (article #2).

### **3.4. Validation *ex vivo* du ciblage de ICAM-1 par une plateforme d'histologie massive**

Un des objectifs secondaires de ce projet de recherche visait à valider la spécificité du signal NIRF obtenu avec la sonde d'imagerie ciblant ICAM-1 par une nouvelle plateforme d'histologie massive en 3D *ex vivo* [436]. En somme, la reconstruction complète de l'artère coronaire par une méthode d'imagerie combinant OCT et microscopie confocale en fluorescence permet de visualiser l'architecture complète du vaisseau de même que la composition moléculaire de la paroi, modalité qui est supérieure aux études histopathologiques actuelles qui permettent l'analyse d'un nombre limitée de coupes transversales d'un tissu (article #3) [436]. Nous avons pu démontrer une colocalisation du signal fluorescent *ex vivo* détecté par imagerie *in vivo* suivant l'infusion d'anticorps anti-ICAM-1 au sein d'artères coronaires porcines (article #2). La détection du signal fluorescent *ex vivo* était principalement localisé à la surface de la paroi artérielle, suggérant que le traceur d'imagerie ciblant ICAM-1 fixe spécifiquement le ligand à la surface des plaques lipidiques. Malgré la déshydratation et raccourcissement des tissus en *ex vivo*, la reconstruction longitudinale 3D *ex vivo* de l'artère a permis d'effectuer une coregistration des résultats d'imagerie acquis *in vivo* par IVUS ou OCT.

## **4. L'imagerie moléculaire intravasculaire de l'athérosclérose par NIR-fluorescence (NIRF) : la modalité d'imagerie *in vivo* du futur?**

Les technologies d'imagerie intravasculaire de l'athérosclérose actuellement exploitées, dont l'ultrasonographie (IVUS), la tomographie par cohérence optique (OCT) et la spectroscopie proche infrarouge (NIRS), permettent d'évaluer les caractéristiques

morphologiques de la plaque d'athérome telles que le degré d'une sténose endoluminal et la sévérité du fardeau lipidique. Toutefois, celles-ci ne donnent que très peu d'informations sur les processus pathobiologiques de la plaque, un aspect essentiel dans l'évaluation de la progression de l'athérogenèse et des complications associées. De surcroît, les modalités d'imagerie intravasculaires contemporaines ne peuvent à elles seules évaluer simultanément tous les aspects morphologiques associés au phénotype de vulnérabilité de la plaque, dont l'épaisseur de la chape fibreuse, le contenu en lipides, la taille du centre nécrotique et le degré d'inflammation locale. Ainsi, l'émergence de nouvelles approches d'imagerie combinées à l'imagerie moléculaire *in vivo* permettrait d'évaluer simultanément la biologie et l'architecture de la plaque en ciblant une combinaison de biomarqueurs clés impliqués dans l'instabilité et la rupture de plaque.

#### 4.1. Le système d'imagerie par cathéter IVUS-NIRF

La plateforme d'imagerie utilisée dans ce projet consiste en un système d'imagerie intravasculaire hybride permettant l'acquisition simultanée d'images par IVUS et NIRF suivant un recul automatisé du cathéter. Préalablement décrit et validé dans des modèles fantômes et des lapins athérosclérotiques [293, 302], ce système d'imagerie a permis de quantifier le signal NIRF *in vivo* suivant l'injection locale de deux sondes moléculaires marquées à des fluorophores distincts, soient IR800W (Excitation/Émission, 730/776 nm) couplé aux fragments d'anticorps anti-ICAM-1 et Alexa-660 (Excitation/Émission, 660/716 nm) couplé aux peptides ciblant le collagène type-I non polymérisé. Ainsi, notre hypothèse de départ, qui était que l'imagerie invasive bimodale IVUS-NIRF permettrait de surmonter les limitations d'une seule modalité d'imagerie en évaluant simultanément l'activité inflammatoire et la composition de la plaque, a été validée dans l'article #1; nous avons démontré que le système d'imagerie par cathéter a l'habileté de discriminer précisément le signal NIRF *in vivo* au sein d'un même animal suivant l'infusion simultanée de sondes couplées à des fluorophores émettant dans des régions spectrales distinctes. Par conséquent, il est tout à fait plausible d'envisager l'injection d'une combinaison d'agents biologiques fluorescents spécifiques à différents biomarqueurs moléculaires de la plaque, combinée à une technologie d'imagerie invasive hybride par cathéter pour visualiser simultanément l'architecture de

la plaque (IVUS ou OCT), afin d'améliorer la sensibilité et spécificité de détection des plaques d'athérosclérose à haut risque *in vivo*. Bien qu'elle soit au stade de développement préclinique, la fluorescence proche infrarouge (NIRF) *in vivo* par cathéter, couplée à l'utilisation endogène de sondes moléculaires ciblées, semble être une application d'imagerie moléculaire potentiellement exploitable pour la détection des plaques d'athérosclérose coronariennes à haut risque chez l'humain.

#### 4.2. Les sondes moléculaires d'imagerie ciblées

L'imagerie intravasculaire par fluorescence proche infrarouge (NIRF) offre la possibilité d'identifier les biomarqueurs caractérisant les plaques à haut risque associés à la survenue d'événements cardiovasculaires adverses. Couplée à des agents d'imagerie spécifiques, la fluorescence peut détecter l'athérosclérose à des stades prématurés (subclinique) de la maladie athérosclérotique, permettant d'établir précocement un diagnostic, d'évaluer le pronostic et d'instaurer un traitement efficace avant la survenue d'événements ischémiques cardiaques. Toutefois, la translation de l'imagerie NIRF en clinique est actuellement limitée par l'absence d'agents biologiques d'imagerie approuvés chez l'humain en raison des coûts importants associés au développement, du risque de toxicité par administration systémique et de par la faible sensibilité de détection des traceurs d'imagerie moléculaire actuels.

Afin de pallier ces limitations, nous avons développé une technique d'injection locale des sondes d'imagerie moléculaire au site d'une plaque d'athérosclérose dans le but de : (1) limiter les effets adverses (toxicité, réaction immunitaire/allergique) pouvant survenir suivant l'administration d'un agent biologique marqué par voie systémique; (2) d'optimiser la biodistribution et la diffusion du traceur d'imagerie au site d'intérêt et par conséquent; (3) diminuer les délais d'acquisition des images *in vivo*. Notre seconde hypothèse de travail, suggérant que l'injection locale en faible concentration de sondes d'imagerie ciblant ICAM-1 et le collagène de type-I non polymérisé permettrait d'obtenir un signal NIRF *in vivo* au sein d'une plaque

d'athérome d'aortes de lapins athérosclérotiques et d'artères coronaires de porcs diabétiques et hypercholestérolémiques, fut validée et présentée dans les articles #1 et #2, respectivement. Alors que l'imagerie par fluorescence a démontré sa capacité à cibler plusieurs biomarqueurs moléculaires de l'athérosclérose, la plupart des études publiées ont été jusqu'alors réalisées chez la souris. La translation de cette technologie d'imagerie chez les grands animaux, de même que chez l'humain, nécessite de résoudre la problématique de dosage des traceurs d'imagerie moléculaire. En assumant que la dose administrée de la sonde moléculaire d'imagerie doit être ajustée en fonction du poids corporel de l'animal afin d'assurer une biodistribution systémique optimale de celui-ci, les volumes administrés chez les gros animaux et les humains (quelques mL) seraient 1000 fois supérieurs à ceux injectés chez la souris (quelques  $\mu$ l), où la synthèse de molécules complexes à cette échelle s'avère complexe et très coûteuse. Dans notre étude, les dosages de sondes moléculaires utilisées pour l'injection *in vivo* sont entre 6 à 50 fois plus faibles que les dosages généralement administrés par voie systémique (0.04-0.4 mg/kg vs. 10 mg/kg IV chez le lapin et 0.25-0.50 mg/kg IV chez l'humain) [298-300, 465]. D'un point de vue coût-efficacité, le développement et la production de traceurs d'imagerie ciblés biocompatibles et non toxiques, administrés en faible concentration à proximité de la plaque et générant un signal hautement spécifique, semble être une approche clinique envisageable et attrayante pour l'imagerie moléculaire de l'inflammation au sein de la plaque d'athérosclérose coronarienne chez l'humain dans des études futures.

## **5. Translation de la technique d'imagerie intravasculaire chez l'humain : une application clinique envisageable?**

### **5.1. La cinétique des sondes d'imagerie moléculaire**

La pharmacodynamique des deux sondes moléculaires est l'un des éléments clé de notre projet de recherche, démontrant que les traceurs d'imagerie injectés *in vivo* permettent de distinguer les segments d'artères athéromateuses des artères normales

avant l'atteinte d'un état d'équilibre. Nous avons effectué de l'imagerie *in vivo* chez les lapins athérosclérotiques à différents temps donnés afin d'évaluer la stabilité du signal NIRF suivant l'injection d'une dose fixe des traceurs d'imagerie (0.04-0.4 mg/kg/lapin). L'article #1 démontre clairement l'atteinte d'une stabilité environ 40 minutes suivant l'injection *in situ* des deux sondes d'imagerie, et celles-ci demeurent stables à 50 minutes. La détection du signal *in vivo* chute initialement entre 20 à 40 minutes suivant l'infusion locale, ce qui pourrait s'expliquer par une saturation initiale des ligands, suivi d'une diminution rapide du signal probablement reliée à la clairance systémique des agents biologiques non liés et à la diffusion locale initiale des sondes fixées à la surface de la plaque. Par la suite, l'intensité du signal augmente afin d'atteindre un état de stabilité entre 40-50 minutes. Cette observation pourrait résulter de la redistribution systémique et l'accumulation des traceurs au site des plaques d'athérome, principalement dans le cas de l'anticorps ciblant ICAM-1. D'autre part, le peptide ciblant le collagène type-I non polymérisé a été décrit comme un ligand transitoire à la cible (spectroscopie par résonance magnétique, résultats publiés dans le brevet US : 2016/0168210 A1, Ni et al. 2013). Il est plausible que la sonde peptidique diffuse plus facilement dans la plaque que les fragments d'anticorps après infusion locale, ce qui permet d'observer une saturation plus rapide des ligands *in vivo*. De plus, l'imagerie *ex vivo* des aortes de lapins a révélé la présence de signal NIRF focal et diffus provenant de segments artériels riches en lipides en amont de la zone de dénudation artérielle, plus précisément dans l'aorte thoracique, ce qui pourrait également expliquer une diminution de la redistribution de la sonde peptidique au site lésé de l'aorte abdominale distale à des temps d'imagerie subséquents.

Bien que les propriétés de diffusion des sondes moléculaires dans la plaque soient actuellement inconnues, l'un pourrait faire valoir que le moment optimal pour l'imagerie *in vivo* est au-delà de 40-45 minutes (ou plus précoce pour la sonde peptidique ciblant le collagène), mais selon les courbes de cinétiques *in vivo* et *ex vivo* des deux traceurs d'imagerie présentées dans l'article #1, par comparaison aux contrôles négatifs, un état d'équilibre semble être atteint entre 40 et 50 minutes pour le

dosage injecté *in situ*. Il demeure possible que l'infusion d'une concentration plus faible des sondes permettrait l'atteinte plus rapide d'un état d'équilibre permettant d'optimiser le délai entre l'infusion du traceur fluorescent et l'imagerie IVUS-NIRF *in vivo*, mais sans toutefois compromettre la détection des plaques d'athérome. Sachant que la réalité d'un cardiologue interventionnel est de prodiguer des coronarographies diagnostiques et à visée thérapeutique dans le cadre d'un horaire très fréquemment chargé, l'application d'une telle technologie d'imagerie nécessitera un outil d'imagerie performant permettant d'identifier spécifiquement les plaques à haut risque dans un laps de temps bien défini afin d'assurer une efficacité des soins et ce, tout en évitant la survenue de complications péri-procédurales. Des études ultérieures sur la pharmacocinétique des sondes moléculaires, évaluant différents dosages, seront essentielles afin de déterminer le dosage approprié requis pour l'obtention d'un état d'équilibre plus rapide dans l'optique d'une translation de cette application dans la pratique future.

## **5.2. Technique d'injection *in situ* des sondes d'imagerie moléculaire**

En 1997, Brieger et Topol ont décrit le concept de dispositifs d'administration locale de médicaments/drogues pour le traitement de la resténose intra-stent, dont le potentiel écueil de cette application clinique était le risque de trauma local du vaisseau sanguin ou d'obstruction du flot sanguin par utilisation d'un dispositif endovasculaire permettant l'administration locale, au site d'intérêt, d'une quantité substantielle d'un agent biologique dans la paroi vasculaire. Le concept d'injection locale de sondes d'imagerie dans le but d'identifier les plaques d'athérosclérose à haut risque est élégant puisqu'il offre plusieurs avantages, dont l'infusion locale de microdosages des sondes d'imagerie au site de la plaque et par conséquent, une réduction des risques potentiels de toxicité systémique, d'une biodistribution insuffisante du traceur dans la/les régions d'intérêts et des coûts liés à la production des agents de contraste. Un cathéter-ballon microporeux, semi-compliant, a été utilisé comme dispositif d'administration local des traceurs d'imagerie, dont la taille correspondait au diamètre du vaisseau mesuré par QCA avant l'infusion *in situ* de ceux-ci. Ce cathéter-ballon poreux nous a permis

d'injecter les traceurs moléculaires au site d'une plaque d'athérome par gonflement du ballon à basse pression (2-4 atmosphères), permettant à la sonde d'imagerie moléculaire d'entrer en contact direct avec l'intima du vaisseau et ce, tout en évitant la rupture de la plaque sous-jacente ou d'induire un trauma vasculaire. Ainsi, les caractéristiques de compliance du ballon microporeux de même que l'inflation à basse pression ont permis de réaliser un gonflement sécuritaire dans la région d'intérêt tout en évitant la sur-expansion du ballon.

Tel que démontré dans l'article #1, la présence d'un signal NIRF observé en dehors de la zone lésée de l'aorte abdominale dénudée des lapins athérosclérotiques, suivant l'infusion locale de la sonde ciblant le collagène de type-I non polymérisé, suggère qu'un autre vecteur d'administration des traceurs d'imagerie moléculaire pourrait être utilisé comme alternative au dispositif intravasculaire par ballon microporeux dans les artères coronaires. Reconnaisant le risque relatif d'injure vasculaire et de survenue d'événements adverses péri-procéduraux (i.e. altération de la plaque, dissection, thrombose, etc.) par utilisation d'un ballon, il est concevable que l'application de cette méthode d'imagerie pourrait s'avérer techniquement complexe dans la pratique clinique. Ainsi, l'injection d'agents biologiques au moyen d'un cathéter porteur pourrait constituer une alternative plausible et sécuritaire, mais l'infusion du traceur spécifiquement dans la région d'intérêt serait alors moins sélective. Cependant, d'un point de vue méthodologique, cette stratégie est potentiellement envisageable et d'intérêt puisqu'elle assure une distribution complète du ou des traceurs d'imagerie dans toute l'artère coronaire et a ainsi le potentiel de détecter plusieurs plaques d'athérome à haut risque, parfois peu sténosantes, par recul automatisé du cathéter d'imagerie intravasculaire. Cette technique permettrait de surpasser les limites actuelles de l'angiographie coronarienne conventionnelle en évaluant l'étendue réelle de la maladie athérosclérotique dans la paroi artérielle. Une autre alternative serait l'utilisation d'un microcathéter ou d'un cathéter de thrombectomie coronarienne disponibles en laboratoire de cathétérisme cardiaque afin d'assurer l'injection locale, plus sélective, de sondes d'imagerie moléculaires à

proximité d'une plaque, et ce sans risque de compromettre le flot sanguin ou l'architecture vasculaire.

## CONCLUSION

Alors que les technologies d'imagerie anatomique invasives contemporaines ont failli à identifier les plaques présentant un phénotype spécifique de rupture, l'imagerie moléculaire *in vivo* est une approche d'imagerie en émergence permettant de visualiser les processus biologiques actifs impliqués dans la genèse de l'athérosclérose. L'application de la technique d'imagerie novatrice proposée dans cette thèse de doctorat pour l'évaluation de la plaque d'athérosclérose *in vivo* par fluorescence proche infrarouge (NIRF) combinée à des agents d'imagerie ciblant des biomarqueurs de la plaque en temps réel pourrait ouvrir la voie à une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la plaque et de la progression temporelle de la maladie nécessaires au développement de nouveaux agents biologiques ciblés pour le traitement de l'athérosclérose coronarienne (médecine personnalisée).

Bien que les résultats présentés dans ce travail soient très préliminaires, nous croyons que la translation en laboratoire de cathétérisme cardiaque d'une technologie d'imagerie moléculaire invasive par cathéter en fluorescence proche infrarouge combinée à l'injection de multiples sondes moléculaires à faible dosage ciblant un panel de biomarqueurs permettrait la détection *in vivo* de plaques d'athérome à haut risque dans les artères coronaires humaines. Le développement d'un cathéter NIRF compatible aux artères coronaires, couplé à des agents d'imagerie réglementés ayant été approuvés pour l'usage chez l'humain et ciblant différentes composantes de l'inflammation (ICAM-1) et du remodelage tissulaire (collagène), sera requis pour l'application clinique de cette technologie dans le futur.

# LIMITATIONS

Bien que cette thèse de recherche démontre la faisabilité d'une modalité d'imagerie moléculaire intravasculaire IVUS-NIRF *in vivo* combinée à des traceurs ciblés comme méthode d'évaluation de la biologie des plaques d'athérosclérose, plusieurs limitations ont été relevées :

## 1. L'hétérogénéité des modèles animaux

- Les différents niveaux de susceptibilité des modèles animaux à développer de l'athérosclérose induite par une diète riche en gras, de même que la vitesse d'apparition des plaques, confèrent une hétérogénéité importante entre les espèces animales, de même qu'entre les animaux d'une même race, ce qui représente une limitation majeure dans la reproductibilité du modèle. Nous avons observé des différences considérables dans la quantité de plaques en présence au sein de l'aorte abdominale distale de deux groupes de lapins étudiés à différentes périodes et ce, malgré l'application du même protocole de dénudation au ballon, de l'âge et la race des lapins utilisés, de la durée de la diète et des conditions d'hébergement. Une variabilité dans le nombre de plaques, leur localisation et leur complexité a également été observée chez les porcs diabétiques, dont ceux imagés à 22 semaines (N=3), bien que ceux-ci étaient de la même race, du même âge, nourris avec la même diète hypercholestérolémique et avec des apports caloriques identiques.
- L'induction chimique d'un diabète de type 1 par alloxane chez les porcs diffère de la pathophysiologie du diabète de type 2 chez l'humain, consistant au développement d'une résistance à l'insuline, ce qui a pu moduler l'expression de ICAM-1 de même que le développement de l'athérosclérose coronarienne. De plus, il est possible que les différences observées dans le développement de la maladie coronarienne et le stade d'évolution de l'athérogenèse soient attribuées aux différences des niveaux de glycémies sériques entre les animaux de même que l'administration exogène quotidienne d'insuline sous-cutanée.

## 2. Faible nombre d'animaux

- De par le faible nombre de porcs miniatures à l'étude, nous n'avons pu réaliser d'analyses de corrélation pour quantifier le signal NIRF *in vivo* en fonction du stade de progression de la plaque et la durée de l'état d'hyperglycémie et de la diète enrichie.
- Compte tenu des coûts importants associés à l'acquisition des animaux, nous n'avons pu sélectionner un animal sain de la même race à titre de contrôle négatif afin d'évaluer l'impact du diabète et de la diète sur le développement de l'inflammation des artères coronaires.

## 3. Difficultés techniques des interventions percutanées

- La complexité des interventions invasives chez le porc, dont les accès vasculaires et le vasospasme coronarien, a mené à plusieurs décès prématurés en cours de processus de cathétérisme cardiaque ayant limité d'obtention de résultats chez certains animaux.
- Compte tenu de l'instabilité hémodynamique fréquente des animaux, il était souvent difficile de réaliser l'ensemble des modalités d'imagerie intravasculaire dont l'IVUS et l'OCT, avant l'injection des sondes et l'imagerie par cathéter IVUS-NIRF.

## 4. Les sondes moléculaires

- Puisqu'une seule dose des sondes moléculaires fut évaluée dans ce projet, et que les propriétés de diffusion de celles-ci ne sont pas connues, il est possible que le temps optimal pour l'imagerie *in vivo* par cathéter soit au-delà ou en-deçà de 40 minutes suivant l'infusion *in situ* des traceurs d'imagerie.
- Sachant que les fragments d'anticorps ciblant ICAM-1 sont humanisés, il est possible que l'affinité de liaison au ligand chez les lapins et les porcs soit ainsi diminuée et que par conséquent, nous avons observé un signal NIRF plus faible chez de nombreux animaux.

- En raison de l'instabilité hémodynamique des animaux et du faible nombre de porcs à l'étude, très peu de sondes ciblant le collagène ont été injectées dans les artères coronaires (N=4), ce qui explique l'absence d'analyse des résultats dans l'article #2.
- L'interprétation de résultats étaient parfois difficile chez les porcs puisqu'en raison de l'instabilité hémodynamique qui pouvait survenir, le ralentissement ou stagnation du flot coronarien suivant l'injection locales de sondes ICAM-1 menait à l'accumulation de celle-ci au sein de l'artère coronaire et générant une saturation du signal détecté par le cathéter (faux positif). Nous avons dû exclure ces données des analyses afin de ne pas fausser l'interprétation des résultats obtenus dans des conditions optimales avec la sonde ICAM-1.
- L'obtention de signal avec deux contrôles négatifs spécifiques à la sonde collagène dans des régions riches en lipides des aortes de lapins athérosclérotiques (article #1), de même qu'avec deux contrôles négatifs spécifiques à la sonde ICAM-1 dans des artères coronaires des porcs (article #2), est probablement le résultat de liaisons non spécifiques des sondes pour le ligand à la surface d'un endothélium lésé possiblement plus perméable que les régions saines du vaisseau.
- L'applicabilité actuelle des sondes moléculaires pour des études cliniques chez l'humain est limitée par l'absence d'essais cliniques nécessaires afin de répondre aux exigences de la FDA.

##### 5. Le cathéter d'imagerie IVUS-NIRF

- Le prototype actuel du cathéter bimodal IVUS-NIRF dispose d'une fibre optique rigide et de gros diamètre, ce qui a été une limitation majeure dans les techniques d'imagerie *in vivo* des artères coronaires de porcs puisqu'il était impossible d'avancer le cathéter au-delà du segment proximal des artères. En conséquence, nous avons engendré des complications telles que des dissections coronariennes, du vasospasme et « *no reflow* », ce qui a mené au décès prématuré de certains animaux en cours de procédure. De surcroît, la longueur des retraits automatisés du cathéter lors des acquisitions d'imagerie *in vivo* était plus courte de par la position proximale de ce dernier dans l'artère coronaire,

ce qui a limité l'acquisition d'informations *in vivo* dans les artères coronaires pathologiques.

- De plus, le calibre du cathéter a limité la distance entre le cathéter et la paroi de vaisseaux de petits calibres, ce qui a entraîné une diminution d'intensité du signal NIRF chez certains animaux puisque l'impulsion du signal n'était pas perçue par le cathéter. Pour cette raison, il fut également difficile d'appliquer l'algorithme de correction pour l'atténuation du signal dans le sang. L'obtention d'images par IVUS de moins bonne qualité chez les lapins et les porcs pourrait également s'expliquer par le calibre actuel du cathéter.
- Des cathéters porteurs de 8 F ont été utilisés afin d'accommoder la taille du cathéter d'imagerie, ce qui a augmenté l'incidence de vasospasme et le risque de dissection lors de la cannulation des ostia coronariens.

## PERSPECTIVES

Afin de développer une technologie d'imagerie précise permettant d'évaluer la biologie de la plaque par fluorescence proche infrarouge de même que l'architecture vasculaire, le développement d'une nouvelle plateforme d'imagerie *in vivo* disposant d'une fibre optique de plus petit calibre et plus souple sera cruciale pour la translation de cette technologie dans de futures applications intravasculaires précliniques et cliniques. Le second prototype devrait combiner la fluorescence proche infrarouge NIRF à la tomographie par cohérence optique (OCT), en remplacement de l'ultrasonographie intravasculaire (IVUS), pour l'imagerie de la composition de la paroi puisque l'OCT a une résolution nettement supérieure à l'IVUS et permet l'acquisition rapide d'images de la paroi artérielle à l'échelle microscopique. De plus, en effectuant au préalable une vidange du sang avec produit de contraste ou salin dans l'artère coronaire, étape nécessaire pour l'acquisition d'images par OCT, ceci confère un avantage supplémentaire par rapport à l'IVUS en maximisant la sensibilité du signal NIRF *in vivo* par évacuation des sondes moléculaires non liées à la cible pouvant saturer le signal détecté par le cathéter et ainsi générer un signal faussement élevé (faux positif).

L'utilisation de sondes moléculaires ciblées, couplées à la modalité d'imagerie intravasculaire bimodal, est d'intérêt afin d'évaluer les déterminants de la plaque à haut risque. Ainsi, le développement de nouveaux traceurs biologiques ciblant différents biomarqueurs de l'inflammation, dont les métalloprotéinases, les LDL-oxydés, l'apoptose, les macrophages, etc. pourrait s'avérer la technique d'imagerie de l'avenir afin d'améliorer nos connaissances de la pathophysiologie de la maladie coronarienne athérosclérotique de même que pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. Le développement de sondes moléculaires activables serait une avenue à considérer afin d'augmenter la spécificité du signal NIRF *in vivo*. Il sera mandatoire que les sondes d'imagerie, une fois évaluées dans des études précliniques, puissent entrer rapidement dans les processus d'évaluation régulés par la FDA afin de pouvoir être considérés sécuritaires pour des études cliniques chez l'humain.

Compte tenu des résultats prometteurs obtenus avec la sonde moléculaire ciblant ICAM-1, il serait d'intérêt de réévaluer celle-ci avec un nouveau cathéter d'imagerie bimodal OCT-NIRF dans un modèle animal porcin similaire à celui utilisé dans ce projet de recherche, mais avec un plus grand nombre d'animaux disposés en trois groupes distincts : porc sain sous diète normale, porc sain sous diète riche en cholestérol et porc diabétique sous diète enrichie. Ainsi, nous aurions un spectre plus élargi sur le rôle potentiel de ICAM-1 dans le développement et l'évolution temporelle de l'athérogenèse.

## BIBLIOGRAPHIE

1. World Health Organization: The Global Burden of Disease: 2004 Update. 2008; World Health Organization Geneva, Switzerland.
2. Gaziano, TA and Gaziano JM. Global burden of cardiovascular disease. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1-19.
3. Lopez AD, Mathers CD, Ezzeti M, Jamison DT, Murray CJL. Global burden of disease and risk factors. 1<sup>st</sup> edition. Washington (DC): The International Bank for reconstruction and development/The World Bank; New York: Oxford University Press, 2006.
4. Reddy KS. Cardiovascular disease in non-Western countries. N Engl J Med. 2004; 350(24):2438-2440.
5. Cassar A, Holmes Jr DR, Rihal CS, Gersh BJ. Chronic coronary artery disease: diagnosis and management. Mayo Clin Proc. 2009; 84(12):1130-1146.
6. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee Heart disease and stroke statistics-2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2009; 119(3):480-486.
7. Trivellato M, Angelini P, Leachman RD. Variations in coronary artery anatomy: normal versus abnormal. Cardiovasc Dis. 1980; 7(4):357-370.
8. The BARI Protocol. Protocol for the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation. Circulation. 1991; 84(Suppl. V):V1-V27.
9. Camici PG, d'Amati G, Rimoldi O. Coronary microvascular dysfunction: mechanisms and functional assessment. Nat Rev Cardiol. 2015; 12:48-62.
10. Canty JM Jr. Coronary blood flow and myocardial ischemia. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1049-1075.
11. Hoffman JIE. Transmural myocardial perfusion. Prog Cardiovasc Dis. 1987; 29:429-464.

12. Canty JM Jr, Giglia J, Kandath D. Effect of tachycardia on regional function and transmural myocardial perfusion during graded coronary pressure reduction in conscious dogs. *Circulation*. 1990; 82:1815-1825.
13. Gould KL. Does coronary flow trump coronary anatomy? *J Am Coll Cardiol Img*. 2009; 2(8):1009-1023.
14. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*. 2001; 104(24):2981-2989.
15. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD: The Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)\American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2018; 00:1-33.
16. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD: the writing group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol*. 2012; 9:620-633.
17. Cheitlin MD, McAllister HA, de Castro CM. Myocardial infarction without atherosclerosis. *JAMA*. 1975; 231(9):951-959.
18. Dawber TR, Moore FE, Mann GV. Coronary heart disease in the Framingham study. *Am J Public Health Nations Health*. 1957; 47(4 Pt 2):4-24.
19. Hajar R. Risk factors for coronary artery disease: historical perspectives. *Heart Views* 2017; 18(3):109-114.
20. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998; 97(18):1837-1847.
21. The University of Edinburgh Cardiovascular risk calculator. Edingburgh. Cardiovascular risk calculator and chart v3.0. [updated: Feb 10 2010]. Available from: <http://cvrisk.mvm.ed.ac.uk/help.htm>.
22. Kannel WB, Feinleib M. Natural history of angina pectoris in the Framingham study: prognosis and survival. 1972; 29(2):154-163.

23. Morrow DA, Boden WE. Stable ischemic heart disease. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1220-1257.
24. Diamond GA. A clinically relevant classification of chest discomfort. *J Am Coll Cardiol.* 1983; 1(2, pt 1):574-575.
25. Campeau L. Grading of angina pectoris. *Circulation.* 1976; 54(3):522-523.
26. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): Developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation.* 2007; 116(7):e148-304.
27. Ashley EA, Niebauer J. Cardiovascular examination. In: *Cardiology explained.* 1<sup>st</sup> edition. London: Remedica; 2004. p. 5-14.
28. Constant J. *Essentials of bedside cardiology.* 2<sup>nd</sup> edition. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2003. pp. 298.
29. Lilly LS and Jung H. The cardiac cycle: mechanisms of heart sounds and murmurs. In: *Pathophysiology of heart disease.* 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.
30. Mancini GBJ, Gosselin G, Chow B, et al. Canadian cardiovascular society guidelines for the diagnosis and management of stable ischemic heart disease. *Can J Cardiol.* 2014; 30:837-849.
31. Connolly DC, Elveback LR, Oxman HA. Coronary heart disease in residents of Rochester, Minnesota: IV, Prognostic value of the resting electrocardiogram at the time of initial diagnosis of angina pectoris. *Mayo Clin Proc.* 1984; 59(4):247-250.
32. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina – summary article: a report of the

- American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the management of patients with chronic stable angina). *Circulation*. 2003; 107(1):149-158.
33. Pryor DB, Shaw L, Harrell Jr FE, et al. Estimating the likelihood of severe coronary artery disease. *Am J Med*. 1991; 90:553-562.
  34. Hubbard BL, Gibbons RJ, Lapeyre AC III, et al. Identification of severe coronary artery disease using simple clinical parameters. *Arch Intern Med*. 1992; 152(2):309-312.
  35. Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012; 33:2569-2619.
  36. Savonitto S, Ardissino D, Granger CB, et al. Prognostic value of the admission electrocardiogram in acute coronary syndrome. *JAMA* 1999; 281:707-713.
  37. Roffi M, Patrono C, Mueller C, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndrome in Patients Presenting without Persistent St-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016; 37(3):267-315.
  38. Gibbons RJ, Balady GJ, Bricker JT, et al. ACC/AHA 2002 Guidelines update for exercise testing: summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to update the 1997 Exercise Testing Guidelines). *Circulation*. 2002; 106(14):1883-1892.
  39. Lairikyengbam SKS. Interpreting exercise treadmill tests needs scoring system. *BMJ*. 2002; 325(7361):443.
  40. Chaitman BR. Exercise stress testing. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 168-199.
  41. Cannon CP, Braunwald E. Unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1178-1209.

42. Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 1996; 335:1342-1349.
43. Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, et al. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. GUSTO IIA Investigators. *N Engl J Med.* 1996; 335:1333-1341.
44. Twerenbold R, Boeddinghaus J, Nestelberger T, et al. Clinical Use of High-Sensitivity Cardiac Troponin in Patients with Suspected Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70(8):996-1012.
45. Januzzi JL, Bamberg F, Lee H, et al. High-sensitivity troponin T concentrations in acute chest pain patients evaluated with cardiac computed tomography. *Circulation.* 2010; 121:1227-1234.
46. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60:1581-1598.
47. Apple FS, Jaffe AS, Collinson P, et al. IFCC Task Force on clinical applications of cardiac bio-markers. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem* 2015; 48:201-203.
48. Morrow DA, Cannon CP, Rafai N, et al. Ability of minor elevations of troponins I and T to predict benefit from an early invasive strategy in patients with unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction: results from a randomized trial. *JAMA.* 2001; 286(19):2405-2412.
49. Eggers KM, Lagerqvist B, Venge P, et al. Persistent cardiac troponin I elevation in stabilized patients after an episode of acute coronary syndrome predicts long-term mortality. *Circulation.* 2007; 116(17):1907-1914.
50. Ooi DS, Isotalo PA, Veinot JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clin Chem.* 2000; 46:338-344.
51. Twerenbold R, Wildi K, Jaeger C, et al. Optimal cut-off levels of more sensitive cardiac troponin assays for the early diagnosis of myocardial infarction in patients with renal dysfunction. *Circulation* 2015; 131:2041-2050.

52. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2018; 00:1-33.
53. Blankstein R. Introduction to noninvasive cardiac imaging. *Circulation*. 2012; 125:e267-e271.
54. Connolly HM, Oh JK. Echocardiography. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 201-270.
55. Marwick TH. Stress echocardiography. *Heart*. 2003; 89(1):113-118.
56. Dinshaw H, Delaney P, Reilly JP. Cardiac computed tomography, changing the way we look at the heart. *Ochsner J*. 2009; 9(4):257-265.
57. Budoff MJ, Nasir K, McClelland RL, et al. Coronary calcium predicts events better with absolute calcium scores than age-sex-race/ethnicity percentiles: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53:345-352.
58. Neves PO, Andrade J, Monção H. Coronary artery calcium score: current status. *Radiol Bras*. 2017; 50(3):182-189.
59. Udelson JE, Dilsizian V, Bonow RO. Nuclear cardiology. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 293-336.
60. Tardif JC, Lesage F, Harel F, et al. Imaging biomarkers in atherosclerosis trials. *Circ Cardiovasc Imag*. 2011; 4(3):319-333.
61. Wildgruber M, Swirski FK, Zerneck A. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis. *Theranostics*. 2013; 3(11):865-884.
62. Livieratos, L. Basic principles of SPECT and PET imaging. In *Radionuclide and hybrid bone imaging*. Springer editions. 2012. pp.345-59.
63. Tarking JM, Joshi FR, Rudd JH. PET imaging of inflammation in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2014; 11(8):443-57.
64. Bocher M, Blevins IM, Tsukerman L, et al. A faster cardiac gamma camera with dynamic SPECT capabilities: design, system validation and future potential. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010; 37(10):1887-1902.

65. Kwong RY, Oh JK. Cardiovascular magnetic resonance imaging. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 340-361.
66. Monney P, Jeanrenaud X, Prior JO, et al. Imagerie cardiaque non invasive : apport spécifique en clinique des nouvelles modalités (I). Rev Med Suisse. 2008; 4(159) :1304-1310.
67. Thomsen HS, European Society of Urogenital Radiology (ESUR). ESUR guideline: gadolinium-based contrast media and nephrogenic systemic fibrosis. Eur Radiol. 2007; 17(10):2692-2696.
68. Chamuleau SA, van Eck-Smit BL, Meuwissen M, Piek JJ. Adequate patient selection for coronary revascularization: an overview of current methods used in daily clinical practice. Int J Cardiovasc Imaging. 2002; 18:5-15.
69. Popma JJ. Coronary arteriography. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 406-440.
70. Topol E, Nissen S. Our preoccupation with coronary luminology: the dissociation between clinical and angiographic findings in ischemic heart disease. Circulation. 1995; 92(8):2332-2342.
71. Nikus KC. Coronary angiography. In: Pahlm O, Wagner GS. Multimodal cardiovascular imaging: Principles and clinical applications. 1<sup>st</sup> Edition. McGraw-Hill Companies; 2011. p. 71-80.
72. Mintz GS, Painter JA, Pichard AD, et al. Atherosclerosis in angiographically "normal" coronary artery reference segments: an intravascular ultrasound study with clinical correlations. J Am Coll Cardiol. 1995; 25:1479-1485.
73. Hachamovitch R, Hayes SW, Friedman JD, et al. Comparison of the short-term survival benefit associated with revascularization compared with medical therapy in patients with no prior coronary artery disease undergoing stress myocardial perfusion single photon emission computed tomography. Circulation. 2003; 107(23):2900-2907.
74. Montalescot G, Sechtem U, Achenback S, et al. ESC guidelines on the management of stable coronary artery. Eur Heart J. 2013; 34:2949-3003.

75. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2018; 00:1-96.
76. Nashef SA, Roques F, Sharples LD, et al. EuroSCORE II. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012;41 :734-744.
77. Shahian DM, O'Brien SM, Filardo G, et al. The Society of Thoracic Surgeons 2008 cardiac surgery risk models: Part 1-coronary artery bypass grafting surgery. *Ann Thorac Surg*. 2009; 88:S2-S22.
78. Shahian DM, O'Brien SM, Filardo G, et al. The Society of Thoracic Surgeons 2008 cardiac surgery risk models: Part 3-valve plus coronary artery bypass grafting surgery. *Ann Thorac Surg*. 2009; 88:S43-S62.
79. Sianos G, Morel MA, Kappetein AP, et al. The SYNTAX Score; An angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention*. 2005; 1:219-227.
80. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004; 364:937-952.
81. Thompson PD, Buchner D, Pina IL, et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. A statement from the Council on Clinical Cardiology and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2003; 107:3109-3116.
82. Turnbull F. Blood pressure lowering treatment trialists' collaboration: effects of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Arch Intern Med*. 2005; 165(12):1410-1419.
83. Wilt TJ, Bloomfield HE, MacDonald R, et al. Effectiveness of statin therapy in adults with coronary disease. *Arch Intern Med*. 2004; 164(13):1427-1436.
84. Green DJ, O'Driscoll G, Joyner MJ, et al. Exercise and cardiovascular risk reduction: Time to update the rationale for exercise? *J Appl Physiol*. 1985; 105(2):766-768.
85. Kodama S, Tanaka S, Saito K, et al. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167:999-1008.

86. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J.* 2016; 37:2315-2381.
87. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, et al. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63 (25 Pt B):2960-2984.
88. Anderson TJ, Grégoire J, Hegele RA, et al. 2012 update of the Canadian cardiovascular Society Guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Can J Cardiol.* 2013; 29:151-167.
89. Perk J, De Backer G, Gohlke H, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *Eur Heart J.* 2012. 33:1635-1701.
90. Law MR, Wald NJ. Environmental tobacco smoke and ischemic heart disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2003; 46:31-38.
91. Fiore MC, Smith SS, Jorenby DE, et al. The effectiveness of the nicotine patch for smoking cessation: a meta-analysis. *JAMA.* 1994; 271:1940-1947.
92. Klein S, Burke LE, Bray, GA, et al. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation.* 2004; 110(18):2952-2967.
93. Khosravi A, Akhavan Tabib A, Golshadi I, et al. The relationship between weight and CVD risk factors in a sample population from central Iran. *ARYA Atheroscler.* 2012; 8(2):82-89.
94. Despres JP. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation.* 2012; 126:1301-1313.
95. Nerenberg KA, Zarnke KB, Leung AA, et al. Hypertension Canada's 2018 Guidelines for diagnosis, risk assessment, prevention, and treatment of hypertension in adults and children. *Can J Cardiol.* 2018; 34(5):506-525.

96. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statin. *Lancet*. 2005; 366:1267-1278.
97. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010; 376:1670-1681.
98. Shapiro MD, Fazio S. From lipids to inflammation. New approaches to reducing atherosclerotic risk. *Circ Res*. 2016; 118:732-749.
99. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA guidelines on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults. *Circulation*. 2014; 129:S1-45.
100. Catapano AL, Graham I, De Backer, et al. 2016 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J*. 2016; 37:2999-3058.
101. Bertrand MJ, Tardif JC. Inflammation and beyond: new directions and emerging drugs for treating atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2017; 22(1):1-26.
102. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017; 376:1713-1722.
103. Padwal RS, Bienek A, McAlister FA, et al. Epidemiology of Hypertension in Canada: An Update. *Can J Cardiol*. 2016; 32 :687-694.
104. William B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J*. 2018; 39:3021-3104.
105. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the prevention, Detection, Evaluation and Management of High Blood pressure in Adults. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 71(19):e127-248.
106. Freemantle N, Cleland J, Young P, et al. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ*. 1999; 318(7200):1730-1737.

107. Gheorghide M, Goldstein S. Beta-blockers in the post-myocardial infarction patient. *Circulation*. 2002; 106(4):394-398.
108. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, Ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000; 342(3):145-153.
109. Fox KM, for the EUROpean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial (the EUROPA study). *Lancet*. 2003; 362(9386):782-788.
110. Hammoud T, Tanguay JF, Bourassa MG. Management of coronary artery disease: therapeutic options in patients with diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36(2):355-365.
111. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complication trial. *Diabetes*. 1995; 44:968-983.
112. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complication of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective observational study. *BMJ*. 2000; 321:405-412.
113. Ali Imran S, Agarwal G, Bajaj HS, Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. Targets for glycemic control. *Can J Diabetes*. 2018; 42(1):S42-S46.
114. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen KB, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016; 375:311-322.
115. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2015; 373:2117-2128.
116. Yousuf O, Bhatt DL. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 8:547-559.
117. Deo SV, Dunlay SM, Shah IK, et al. Dual anti-platelet therapy after coronary artery bypass grafting: is there any benefit? A systematic review and meta-analysis. *J Card Surg*. 2013; 28:109-116.
118. Pellaton C, Silvain J, Eeckhout E, et al. Cardiologie. Tests de réactivité plaquettaire : mise à jour pour le praticien. *Rev Med Suisse*. 2014; 10(412-413):24-31.

119. McFadyen JD, Schaff M, Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. *Nat Rev Cardiol.* 2018; 15:181-191.
120. Antithrombosis Trialists Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ.* 2002; 324:71-86.
121. The ASCEND Study Collaborative Group. Effects of aspirin for primary prevention in persons with diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2018; 379:1529-1539.
122. Gaziano JM, Brotons C, Coppolecchia R, et al. Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2018; 392:1036-1046.
123. Newmann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A. et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. The Task Force on myocardial revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 2018; 00:1-96.
124. Mehta SR, Bainey KR, Cantor WJ, et al. 2018 Canadian Cardiovascular Society/Canadian Association of Interventional Cardiology Focused Update of the Guidelines for the Use of Antiplatelet Therapy. *Can J Cardiol.* 2018; 34:214-233.
125. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of Clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001; 345:494-502.
126. Wallentin L. P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J.* 2009; 30:1964-1977.
127. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus Clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007; 357:2001-2015.
128. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus Clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009; 361:1045-1057.
129. Levine GN, Bates ER, Bittl JA, et al. 2016 ACC/AHA Guidelines focused update on duration of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery disease. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2016; 134:e123-e155.

130. Windecker S. 2014 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization: the task force on myocardial revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*. 2014; 35:2541-2619.
131. Tortora GJ, Grabowski SR. Principles of anatomy and physiology. 9<sup>th</sup> edition. New Jersey, USA, Wiley publishing; 2000. pp. 1-1021.
132. Waller BF, Orr CM, Slack JD, et al. Anatomy, histology, and pathology of coronary arteries: a review relevant to new interventional and imaging techniques – Part I. *Clin Cardiol*. 1992; 15:451-457.
133. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P and Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 897-913.
134. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa Vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation*. 2014; 129:2557-2566.
135. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:165-197.
136. Spagnoli LG, Bonanno E, Sangiorgi G, et al. Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med*. 2007; 48:1800-1815.
137. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005; 111:3481-3488.
138. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*. 2011; 104:503-516.
139. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-874
140. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10:53-62.
141. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran. Pathologic basis of diseases. 7<sup>th</sup> edition. 2005. Elsevier, p. 47-86.
142. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(9):678-689.
143. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998; 102:145-152.

144. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, et al. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998; 101(2):353-363.
145. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest.* 1999; 104(8):1041-1050.
146. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115-126.
147. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:508-519.
148. Galkina E, Ley K. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr Drug Targets.* 2007; 8:1239-1248.
149. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(10):802-815.
150. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009; 61(1):22-32.
151. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 1987; 51(5):813-819.
152. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, et al. Cooperative interaction of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest.* 1989; 83(6):2008-2017.
153. Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991; 251:788-791.
154. van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, et al. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1992; 141(6):1427-1433.
155. Davies MJ, Gordon JL, Gearing JH, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-Selectin in human atherosclerosis. *J Pathol.* 1993; 171(3):223-229.
156. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1992; 140(3):665-673.

157. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, et al. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. 1996; 93(4):672-682.
158. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. 1999; 85(2):199-207.
159. Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis*. 2002; 160(2):305-310.
160. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107:1255-1262.
161. Bourdillon MC, Poston RN, Covacho C, et al. ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE<sup>-/-</sup>/ICAM-1<sup>-/-</sup>) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:2630-2635.
162. Collins RG, Velji R, Guevara NV, et al. P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. 2000; 191(1):189-194.
163. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 (8); 17:1517-1520.
164. Komatsu S, Flores S, Gerritsen ME, et al. Differential up-regulation of circulating soluble and endothelial cell intercellular adhesion molecule-1 in mice. *Am. J. Pathol*. 1997; 151:205-214.
165. van Den Engel NK, Heidenthal E, Vinke A, et al. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. *Blood*. 2000; 95:1350-1355.
166. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, et al. Plasma concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998; 351(9096): 88-92.
167. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease

- cases. The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 1997; 96(12):4219–4225.
168. Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. Soluble cell adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation* 2002; 106(7): 820–825.
169. Malik I, Danesh J, Whincup P, et al. Four soluble cell adhesion molecules and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Lancet*. 2001; 358(9286): 971–975.
170. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 104(12):1336–1342.
171. Wallén NH, Held C, Rehnqvist N, et al. Elevated serum intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 among patients with stable angina pectoris who suffer cardiovascular death or non-fatal myocardial infarction. *Eur Heart J*. 1999; 20(14):1039-1043.
172. Haim M, Tanne D, Boyko V, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *J Am Coll Cardiol*, 2002; 39(7):1133–1138.
173. Woollard KJ, Geissman F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and function. *Nat Rev Cardiol*. 2010; 7(2):77-86.
174. Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res*. 2009; 50(Suppl.):S282-S286.
175. Moore KJ, Freeman, MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vas Biol*. 2006; 26(8):1702-1711.
176. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(5):1262-1275.
177. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerosis plaque progression and vulnerability to rupture angiogenesis as a source of intraplaque haemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(10):2054-2061.
178. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987; 316(22):371-375.

179. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, et al. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of “dilated” versus “obstructive” coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 38(2):297-306.
180. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64:403-434.
181. Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res.* 1999; 41(2):376-384.
182. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(12):771-785.
183. Barnes MJ, Farnale RW. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol.* 1999; 34(4):513-525.
184. Campbell JH, Campbell GR. The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1994; 5: 323–330.
185. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Idelson GL, et al. Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis.* 1987; 67(1):9-16.
186. Murata K, Motayama T, Kotake C. Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis.* 1986; 60(3):251-262.
187. Ooshima A, Muragaki Y. Collagen metabolism in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 598:582-584.
188. Smith EB. The influence of age and atherosclerosis on the chemistry of aortic intima. *J Atheroscler Res.* 1965; 5:241-248.
189. Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis.* 1997; 130:133-142.
190. Wesley RB, Meng X, Godin D, et al. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:432-440.
191. Rocnik EF, Chan BM, Pickering JG. Evidence for the role of collagen synthesis in arterial smooth muscle cell migration. *J Clin Invest.* 1998; 101:1889-1898.

192. Tabas I. Macrophages death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev.* 2010; 10:36-46.
193. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011; 145(3):341-355.
194. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, et al. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1998; 101(8):1551-1556.
195. Falk, E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47:C7-C12.
196. Barger AC, Beeuwkes R 3<sup>rd</sup>, Lainey LL, et al. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1984; 310(3):175-177.
197. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, et al. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11(5):1223-1230.
198. Hansson GK, *et al.* Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 1988; 72(2-3):135-141.
199. Hansson GK, Jonasson L, Holm J, et al. Gamma interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and the expression in vivo and in vitro. *Circ Res.* 1988; 63(4):712-719.
200. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014; 114(12):1852-66.
201. Otsuka F, Fuster V, Narula J, et al. Omnipresent atherosclerotic disease: time to depart from analysis of individual vascular beds. *Mt Sinal J Med.* 2012; 79:641-653.
202. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, et al. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J Histochem Cytochem.* 2001; 49(1):79-86.
203. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006; 99(10):1044-1059.
204. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 94(6):2493-2503.

205. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, et al. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*. 1995; 92(6):1393-1398.
206. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001; 104(16):1899-1904.
207. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 1999; 99(19):2503-2509.
208. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, et al. Human monocyte-derived macrophages of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 1995; 92(6):1565-1569.
209. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013; 368:2004-2013.
210. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. 1997; 96(2):396-399.
211. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352(16):1685-1695.
212. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995; 91(11):2844-2850.
213. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, et al. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis*. 2000; 150(2):245-253.
214. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation*. 2014; 129(24):2557-2566.
215. Inoue M, Itoh H, Ueda M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 98(20):2108-2116.
216. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, et al. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*. 2001; 7(4):425-429.

217. Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, et al. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*. 2006; 113(18):2245-2252.
218. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, et al. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. 1996; 93(4):672-682.
219. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003; 349(24):2316-2325.
220. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring: the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*. 1985; 53(4):363-373.
221. De Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, et al. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res*. 1999; 41(2):443-449.
222. Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994; 90(4):2126-2146.
223. Richardson RD, Davies MJ, Born GVR. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet*. 1989; 2:941-944.
224. Lee RT, Kamm RD. Vascular mechanics for the cardiologist. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 23(6):1289-1295.
225. Turitto VT, Hall CL. Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. *Thromb Res*. 1998;92(suppl 2):S25-S31.
226. Cheng GC, Loree HM, Kamm RD, et al. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation. *Circulation* 1993; 87(4):1179-1187.
227. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 2002; 105:657-671.
228. Nishioka T, Luo H, Eigler NL, et al. Contribution of inadequate compensatory enlargement to development of human coronary artery stenosis: an in vivo intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 27:1571-1576.
229. Varnava AM, Mills PG, Davies MJ. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. *Circulation*. 2002; 105:939-943.
230. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, et al. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105:297-303.

231. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, et al. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of “dilated” versus “obstructive” coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38(2):297-206.
232. Gould KL, Lipscomb K, Hamilton GW. Physiologic basis for assessing critical coronary stenosis. Instantaneous flow response and regional distribution during coronary hyperemia as measures of coronary flow reserve. *Am J Cardiol.* 1974; 33(1):87-94.
233. Gould KL, Lipscomb K, Calvert C. Compensatory changes of the distal coronary vascular bed during progressive coronary constriction. *Circulation.* 1975; 51(6):1085-1094.
234. Pijls NH, Fearon WF, Torino PA, et al. Fractional flow reserve versus angiography for guiding percutaneous coronary intervention in patients with multivessel coronary artery disease: 2-year follow-up of the FAME (Fractional flow reserve versus angiography for multivessel evaluation) study. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 56(3):177-184.
235. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, et al. Limitations of angiography in the assessment of plaque distribution in coronary artery disease: a systematic study of target lesion eccentricity in 1446 lesions. *Circulation.* 1996; 93(5):924-931.
236. Tonino, PA, De Bruyne B, Pijls NH, et al. Fractional flow reserve versus angiography for guiding percutaneous coronary intervention. *N Engl J Med.* 2009; 360(3) :213-224.
237. Torino PA, Fearon WF, De Bruyne B, et al. Angiographic versus functional severity of coronary artery stenoses in the FAME study fractional flow reserve versus angiography in multivessel evaluation. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(25):2816-2821.
238. Constantinides P. Plaque fissures in human coronary thrombosis. *J Atheroscler Res.* 1966; 6:1-17.
239. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation.* 2001; 103(7):934-940.
240. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart.* 1999; 82(3):269-272.
241. Mittleman MA, Mostofsky E. Physical, psychological and chemical triggers of acute cardiovascular events: preventive strategies. *Circulation.* 2011; 124(3):346-354.

242. Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis: characteristic of coronary atherosclerotic plaque underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J.* 1983;50(2):127-131.
243. Schwartz RS, Burke A, Farb A, et al. Microemboli and microvascular obstruction in acute coronary thrombosis and sudden coronary death: relation to epicardial plaque histopathology. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54(23):2167-2173.
244. Davies MJ. Stability and instability: the two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture. *Circulation.* 1996; 94(8):2013-2020.
245. Muller JE, Tofler GH, Stone PH. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation.* 1989; 79(4):733-743.
246. Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med.* 1997; 336(18):1276-1282.
247. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol.* 2001; 16(5):285-92.
248. Narula J, Strauss HW. The popcorn plaques. *Nat Med.* 2007; 13(5):532-534.
249. Glaser R, Selzer F, Faxon DP, et al. Clinical progression of incidental, asymptomatic lesions discovered during culprit vessel coronary intervention. *Circulation.* 2005; 111(2):143-149.
250. Brusckhe AV, Kramer JR Jr, Bal ET, et al. The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studies in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times. *Am Heart J.* 1989;117(2):296-305.
251. Yokoya K, Takatsu H, Suzuki T, et al. Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: a study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation.* 1999; 100(9):903-909.
252. Lichtlen PR, Nikutta P, Jost S, et al. The INTACT Study Group. Anatomical progression of coronary artery disease in humans as seen by prospective, repeated, quantitated coronary angiography. Relation to clinical events and risk factors. *Circulation.* 1992; 86(3):828-838.
253. Moise, A, Th eroux P, Taemans Y, et al. Clinical and angiographic factors associated with progression of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1984; 3(3):659-667.

254. Virmani R, Burke AP, Farb A, et al. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 44(5):349-356.
255. Sanchez OD, Sakakura K, Otsuka F, et al. Expectations and limitations in contemporary intravascular imaging: lessons learned from pathology. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014; 12(5):601-611.
256. Guedes A, Tardif JC. Intravascular ultrasound assessment of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2004; 6(3):219-224.
257. Garcia-Garcia HM, Serruys PW. Advances in the invasive diagnosis and treatment of vulnerable coronary plaques. *Eur Cardiol.* 2008; 4(1):105-110.
258. Nissen SE. Halting the progression of atherosclerosis with intensive lipid lowering: results from the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive lipid Lowering (REVERSAL) trial. *Am J Med.* 2005; 118(Suppl 12A):22-27.
259. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: The asteroid trial. *JAMA.* 2006; 295(12):1556-1565.
260. Nicholls SJ, Ballantyne CM, Barter PJ, et al. Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease. *N Engl J Med.* 2011; 365(22):2078-2087.
261. Nair A, Kuban BD, Tuzcu EM, et al. Coronary plaque classification with intravascular ultrasound radiofrequency data analysis. *Circulation.* 2002; 106(17):2200-2206.
262. Garcia-Garcia HM, Mintz GS, Lerman A, et al. Tissue characterization using radiofrequency data analysis: recommendations for acquisition, analysis, interpretation and reporting. *EuroIntervention.* 2009; 5(2):177-189.
263. Sathyanarayana S, Cariler S, Li W, et al. Characterisation of atherosclerotic plaque by spectral similarity of radiofrequency intravascular ultrasound signals. *Eurointervention.* 2009; 5(1):133-139.
264. Rodriguez-Granillo GA, Garcia-Garcia HM, Mc Fadden EP, et al. In vivo intravascular ultrasound-derived thin-cap fibroatheroma detection using ultrasound radiofrequency data analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46(11):2038-2042.
265. Thim T, Hagensen MK, Wallace-Bradley D, et al. Unreliable assessment of necrotic core by virtual histology intravascular ultrasound in porcine coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2010; 3(4):384-391.

266. Puri R, Worthley I, Nicholls J. Intravascular imaging of vulnerable coronary plaque: current and future concepts. *Nat Rev Cardiol.* 2011; 8:131-139.
267. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, et al. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; 364(3):226-235.
268. Calvert PA, Obaid DR, O'Sullivan M, et al. Association between virtual histology intravascular ultrasound findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011; 4(8):894-901.
269. Stone PH, Saito S, Takahashi S, et al. Prediction of progression of coronary artery disease and clinical outcomes using vascular profiling of endothelial shear stress and arterial plaque characteristics: the PREDICTION study. *Circulation.* 2012; 126(2):172-181.
270. Cheng JM, Garcia-Garcia HM, de Boer SP, et al. In vivo detection of high-risk coronary plaques by radiofrequency intravascular ultrasound and cardiovascular outcome: results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Eur Heart J.* 2014; 35(10):639-647.
271. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart.* 2004; 90(12):1385-1391.
272. Narula J, Nakano M, Virmani R, et al. Histopathologic characteristics of atherosclerotic coronary disease and implications of the findings for the invasive and noninvasive detection of vulnerable plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61(10):1041-1051.
273. Kume T, Akasaka T, Kawamoto T, et al. Measurement of the thickness of the fibrous cap by optical coherence tomography. *Am Heart J.* 2006; 152(4):755e1-e4.
274. Maurovich-Horvat P, Schlett CL, Alkadhi H, et al. Differentiation of early from advanced coronary atherosclerotic lesions: systematic comparison of CT, intravascular US, and optical frequency domain imaging with histopathologic examination in ex vivo human hearts. *Radiology.* 2012; 265(2):393-401.
275. Tearney GJ, Regar E, Akasaka T, et al. Consensus standards for acquisition, measurement, and reporting of intravascular optical coherence tomography studies: a report from the International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography Standardization and Validation. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59(12):1058-72.
276. Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. *Science* 1991; 254(5035):1178-1181.

277. Yun SH, Tearney GJ, Vakoc BJ, et al. Comprehensive volumetric optical microscopy in vivo. *Nat Med* 2006; 12(12):1429-1433.
278. Prati F, Regar E, Mintz GS, et al. Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2010; 31(4):401-415.
279. Inami S, Want Z, Ming-Juan Z, et al. Current status of optical coherence tomography. *Cardiovasc Interv and Ther*. 2011; 26:177-185.
280. Waxman S, Dixon SR, L'Allier P, et al. In vivo validation of a catheter-based near-infrared spectroscopy system for detection of lipid core coronary plaques: initial results of the SPECTACL study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009; 2(7):858-868.
281. Wang J, Geng YJ, Guo B, et al. Near-infrared spectroscopic characterization of human advanced atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39(8):1305-1313.
282. Gardner CM, Tan H, Hull EL, et al. Detection of lipid core coronary plaques in autopsy specimens with a novel catheter-based near-infrared spectroscopy system. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2008; 1(5):638-648.
283. Erlinge D. Near-infrared spectroscopy for intracoronary detection of lipid-rich plaques to understand atherosclerotic plaque biology in man and guide clinical therapy. *J Intern Med*. 2015; 278:110-125.
284. Madder RD, Goldstein JA, Madden SP, et al. Detection by near-infrared spectroscopy of large lipid core plaques at culprit sites in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv*. 2013; 6(8):838-846.
285. Madder RD, Smith JL, Dixon SR, et al. Composition of target lesions by near-infrared spectroscopy in patients with acute coronary syndrome versus stable angina. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012; 5(1):55-61.
286. Madder RD, Husaini M, Davis AT et al. Detection by near-infrared spectroscopy of large lipid cores at culprit sites in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction and unstable angina. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2015; 86(6):1014-1021.
287. Oemrawsingh RM, Cheng JM, Garcia-Garcia HM, et al. Near-infrared spectroscopy predicts cardiovascular outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 64(23):2510-2518.

288. Goldstein JA, Maini B, Dixon SR, et al. Detection of lipid-core plaques by intracoronary near-infrared spectroscopy identifies high risk of periprocedural myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011; 4(5):429-437.
289. Kini AS, Baber U, Kovacic JC, et al. Changes in plaque lipid content after short-term intensive versus standard statin therapy: the YELLOW trial. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62(1):21-29.
290. Bertrand MJ, Lavoie-L'Allier P, Tardif JC. Near-infrared spectroscopy (NIRS): a novel tool for intravascular coronary imaging. In: *Developments in near-infrared spectroscopy.* Croatia: InTech Open science; 2017. p. 25-63.
291. Calfon MA, Rosenthal A, Mallas G, et al. In vivo near infrared fluorescence (NIRF) intravascular molecular imaging of inflammatory plaque, a multimodal approach to imaging of atherosclerosis. *J Vis Exp.* 2011; 54:e2257.
292. Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Optical and multimodality molecular imaging insights into atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(7):1017-1024.
293. Abran M, Stähli BE, Merlet N, et al. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits. *Biomed Opt Express.* 2015; 6(10):3989-3999.
294. Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Molecular imaging of cardiovascular disease. *Circulation.* 2007; 116(9):1052-1061.
295. Jaffer FA, Nahrendorf M, Vinegoni C, et al. In vivo imaging of protease activity in atherosclerosis using a near-infrared fluorescence intravascular catheter. *Circulation.* 2006; 114(suppl II):II-410. Abstract.
296. Jaffer FA, Vinegoni C, John MC, et al. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation.* 2008; 118(18):1802-1809.
297. Yoo H, Kim JW, Shishkov M, et al. Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo. *Nat Med.* 2011; 17(12):1680-1684.
298. Kim S, Lee MW, Kim TS, et al. Intracoronary dual-modal optical coherence tomography-near-infrared fluorescence structural-molecular imaging with a clinical dose of indocyanine green for the assessment of high-risk plaques and stent-associated inflammation in a beating coronary artery. *Eur Heart J.* 2016; 37:2833-2844.

299. Vinegoni C, Botnaru I, Aikawa E, et al. Indocyanine green enables near-infrared fluorescence imaging of lipid-rich, inflamed atherosclerotic plaques. *Sci Transl Med.* 2011; 3(84):84ra45.
300. Lee S, Lee MW, Cho HS, et al. Fully integrated high-speed intravascular optical coherence tomography/Near-infrared fluorescence structural/molecular imaging in vivo using a clinically available near-infrared fluorescence-emitting indocyanine green to detect inflamed lipid-rich atheromata in coronary-sized vessels. *Circ Cardiovasc Interv.* 2014; 7:560-569.
301. Jaffer FA, Calfon MA, Rosenthal A. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57(25):2516-2526.
302. Abran M, Cloutier G, Roy Cardinal MH, et al. Development of a photoacoustic, ultrasound and fluorescence imaging catheter for the study of atherosclerotic plaque. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst.* 2014; 8(5):696-703.
303. Ughi GJ, Wang H, Gerbaud E, et al. Clinical characterization of coronary atherosclerosis with dual-modality OCT and near-infrared autofluorescence imaging. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2016; 9(11):1304-1314.
304. Calfon M, Jaffer FA. Molecular intravascular imaging approaches for atherosclerosis. *Curr Cardiovasc Imaging Rep.* 2014; 7(10):9293.
305. Jansen K, Wu M, van der Steen AFW, et al. Photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis in two spectral bands. *Photoacoustics.* 2014; 2:12-20.
306. Allen TJ, Hall A, Dhillon AP, et al. Spectroscopic photoacoustic imaging of lipid-rich plaques in the human aorta in the 740 to 1400 nm wavelength range. *J Biomed Opt.* 2012; 17(6):061209.
307. Fleming CP, Eckert J, Halpern EF, et al. Depth resolved detection of lipid using spectroscopic optical coherence tomography. *Biomed Opt Express.* 2013; 4:1269–84.
308. Jansen K, van Soest G, van der Steen AFW. Intravascular photoacoustic imaging: a new tool for vulnerable plaque identification. *Ultrasound Med Biol.* 2014; 40(6):1037-1048.
309. Jansen K, van der Steen AFW, van Beusekom HMM, et al. Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis. *Opt Lett.* 2011; 36:597-599.

310. Wang B, Karpiouk A, Yeager D, et al. In vivo intravascular ultrasound-guided photoacoustic imaging of lipid in plaques using an animal model of atherosclerosis. *Ultrasound Med Biol*. 2012; 38:2098-2103.
311. Wu M, van der Steen AFW, Regar E, et al. Emerging technology update Intravascular photoacoustic imaging of vulnerable atherosclerotic plaque. 2016; 11(2):120-123.
312. Rodriguez-Granillo G, Regar E, Schaar JA, et al. New insights towards catheter-based identification of vulnerable plaque. *Rev Esp Cardiol*. 2005; 58(10):1197-1206.
313. Madjid M, Willerson JT, Casscells SW. Intracoronary thermography for detection of high-risk vulnerable plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47:C80-85.
314. Casscells W, Hathorn B, David M, et al. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis. *Lancet*. 1996; 347:1447-1451.
315. Verheye S, De Meyer GR, Van Langenhove G, et al. In vivo temperature heterogeneity of atherosclerotic plaques is determined by plaque composition. *Circulation*. 2002; 105:1596-1601.
316. Krams R, Verheye S, van Damme LC, et al. In vivo temperature heterogeneity is associated with plaque regions of increased MMP-9 activity. *Eur Heart J*. 2005; 26:2200-2205.
317. Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, et al. Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo. A new method of detection by application of a special thermography catheter. *Circulation*. 1999; 99:1965-1971.
318. Toutouzas K, Synetos A, Stefanadi E, et al. Correlation between morphologic characteristics and local temperature differences in culprit lesions of patients with symptomatic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49:2264-2271.
319. Wainstein M, Costa M, Ribeiro J, et al. Vulnerable plaque detection by temperature heterogeneity measured with a guidewire system: clinical, intravascular ultrasound and histopathologic correlates. *J Invasive Cardiol*. 2007; 19:49-54,
320. Diamantopoulos L, Liu X, De Scheerder I, et al. The effect of reduced blood-flow on the coronary wall temperature: Are significant lesion suitable for intravascular thermography? *Eur Heart J*. 2003; 24(19):1788-1795.

321. Stefanadis C, Toutouzas K, Tsiamis E, et al. Thermal heterogeneity in stable human coronary atherosclerotic plaques is under-estimated in vivo: the “cooling effect” of blood flow. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41:403-408.
322. Rzeszutko L, Legutko J, Kaluza GL, et al. Assessment of culprit plaque temperature by intracoronary thermography appears inconclusive in patients with acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:1889-1894.
323. Schaar JA, van der Steen AFW, Mastik F, et al. Intravascular palpography for vulnerable plaque assessment. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(8):C86-91.
324. Céspedes EI, Huang Y, Ophir J, et al. Methods for estimation of subsample time delays of digitized echo signals. *Ultrason Imag*. 1995; 17:142-171.
325. Schaar JA, Mastik F, Regar E, et al. Current diagnostic modalities for vulnerable plaque detection. *Curr Pharm Des*. 2007; 13:995-1001.
326. Schaar JA, de Korte CL, Mastik F, et al. Characterizing vulnerable plaque features with intravascular elastography. *Circulation*. 2003; 108 :2636-2641.
327. de Korte CL, Carlier SG, Mastik F, et al. Morphological and mechanical information of coronary arteries obtained with intravascular elastography: a feasibility study in vivo. *Eur Heart J*. 2002; 23:405-413.
328. de Korte CL, Siervogel M, Mastik F, et al. Identification of atherosclerotic plaque components with intravascular ultrasound elastography in vivo: a Yucatan pig study. *Circulation*. 2002; 105:1627-1630.
329. Schaar JA, Regar E, Mastik F, et al. Incidence of high-strain patterns in human coronary arteries: assessment with three-dimensional intravascular palpography and correlation with clinical presentation. *Circulation*. 2004; 109:2716-2719.
330. Ferraro JR, Nakamoto K, Brown CW. *Introductory Raman Spectroscopy*. 2<sup>nd</sup> Edition; Elsevier Science: New York, 2003; pp.1-434.
331. Downes A, Elfick A. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors*. 2010; 10:1871-1889.
332. Brennan JF 3<sup>rd</sup>, Römer TJ, Lees RS, et al. Determination of human coronary artery composition by Raman spectroscopy. *Circulation*. 1997; 96(1):99-105.

333. Silveira L Jr, Sathaiah S, Zângaro RA, et al. Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. *Lasers Surg Med.* 2002; 30(4):290-297.
334. Römer TJ, Brennan JF 3<sup>rd</sup>, Puppels GJ, et al. Intravascular ultrasound combined with Raman spectroscopy to localize and quantify cholesterol and calcium salts in atherosclerotic coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(2):478-483.
335. Van De Poll SWE, Kastelijjn K, Bakker Schut TC, et al. On-line detection of cholesterol and calcifications by catheter based Raman spectroscopy in human atherosclerotic plaque ex vivo. *Heart.* 2003; 89(9):1078-1082.
336. Baraga JJ, Feld MS, Rava RP. In situ optical histochemistry of human artery using near infrared Fourier transform Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(8):3473-3477.
337. Manoharan R, Baraga JJ, Feld MS, et al. Quantitative histochemical analysis of human artery using Raman spectroscopy. *J Photochem Photobiol B.* 1992; 16(2):211-233.
338. Brennan JF, Wang Y, Dasari RR, et al. Near-infrared Raman spectrometer systems for human tissues studies. *Appl Spectrosc.* 1997; 51(2):201-208.
339. Römer TJ, Brennan JF 3<sup>rd</sup>, Fitzmaurice M, et al. Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman spectroscopy. *Circulation.* 1998; 97(9):878-885.
340. Van de Poll SWE, Römer TJ, Volger OL, et al. Raman spectroscopic evaluation of the effects of diets and lipid-lowering therapy on atherosclerotic plaque development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 21(10):1630-1635.
341. Van de Poll SWE, Delsing DJM, Jukema JW, et al. Raman spectroscopic investigation of atorvastatin, amlodipine, and both on atherosclerotic plaque development in APOE-3 Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis.* 2002; 164(1):65-71.
342. Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, et al. Prospects for in vivo Raman spectrometer systems for human tissue studies. *Appl Spectrosc.* 1997; 51:201-208.
343. De Lima CJ, Sathaiah S, Silveira Jr L, Zângaro RA, et al. Development of catheters with low fiber background signal for Raman spectroscopic diagnostic applications. *Artif Organs.* 2000; 24(3):231-234.

344. Suter MJ, Nadkarni SK, Weisz G, et al. Intravascular optical imaging technology for investigating the coronary artery. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011; 4(9):1022-1039.
345. Bourantas CV, Jaffer FA, Gijzen FJ, et al. Hybrid intravascular imaging: recent advances, technical considerations, and current applications in the study of plaque pathophysiology. *Eur Heart J*. 2017; 38(6):400-412.
346. de Boer JF, Milner TE, van Gemert MJC, et al. Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography. *Opt Lett*. 1997; 22:934-936.
347. de Boer JF, Milner TE, Nelson JS. Determination of the depth-resolved Stokes parameters of light backscattered from turbid media by use of polarization-sensitive optical coherence tomography. *Opt Lett*. 1999; 24:300-302.
348. Giattina SD, Courtney BK, Herz PR, et al. Assessment of coronary plaque collagen with polarization sensitive optical coherence tomography (PS-OCT). *Int J Cardiol*. 2006; 107(3):400-409.
349. Nadkarni SK, Pierce MC, Park BH, et al. Measurement of collagen content and smooth muscle cell content in atherosclerotic plaques using polarization-sensitive optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49(13):1474-81.
350. Kuo WC, Chou NK, Chou C, et al. Polarization-sensitive optical coherence tomography for imaging human atherosclerosis. *Appl Opt*. 2007; 46:2520-2527.
351. Kim KH, Park BH, Tu Y, et al. Polarization-sensitive optical frequency domain imaging based on unpolarized light. *Opt Express*. 2011; 19(2):552-561.
352. Liu L, Gardecki JA, Nadkarni SK, et al. Imaging the subcellular structure of human coronary atherosclerosis using micro-optical coherence tomography. *Nat Med*. 2011; 17(8):1010-1014.
353. Lee KS, Rolland LP. Bessel beam spectral-domain high-resolution optical coherence tomography with micro-optic axicon providing extended focusing range. *Opt Lett*. 2008; 33:1696-1698.
354. Leitgeb RA, Villiger M, Bachmann AH, et al. Extended focus depth for Fourier domain optical coherence microscopy. *Opt Lett*. 2006; 31:2450-2452.
355. Honda Y, Fitzgerald PJ. Frontiers in intravascular imaging technologies. *Circulation*. 2008; 117 :2024-2037.

356. Rogers WJ, Prichard JW, Hu YL, et al. Characterization of signal properties in atherosclerotic plaque components by intravascular MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1824-1830.
357. Worthley SG, Helft G, Fuster V, et al. A novel nonobstructive intravascular MRI coil – In vivo imaging of experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:46-50.
358. Wilensky RL, Song HK, Ferrari VA, et al. Role of magnetic resonance and intravascular magnetic resonance in the detection of vulnerable plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47(8 Suppl):C48-C56.
359. Koskinas KC, Ughi GJ, Windecker S, et al. Intracoronary imaging of coronary atherosclerosis: validation for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur Heart J.* 2016; 37:524-535.
360. Li J, Li X, Mohar D, et al. Integrated IVUS-OCT for real-time imaging of coronary atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2014; 7:101-103.
361. Fard AM, Vacas-Jacques P, Hamidi E, et al. Optical coherence tomography – near infrared spectroscopy system and catheter for intravascular imaging. *Opt Express.* 2013; 21:30849-30858.
362. Dixon AJ, Hossack JA. Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *J Biomed Opt.* 2013; 18:56009.
363. Vancraeynest D, Pasquet A, Roelants V, et al. Imaging the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57(20):1961-1979.
364. Di Carli MF. Advances in positron emission tomography. *J Nucl Cardiol.* 2004; 11:719-732.
365. Moon SH, Cho YS, Noh TS, et al. Carotid FDG uptake improves prediction of future cardiovascular events in asymptomatic individuals. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2015; 8(8):949-956.
366. Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature.* 2008; 451(21):953-957.
367. Wickline SA, Neubauer AM, Winter PM, et al. Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles. *J Magn Reson Imaging.* 2007; 25:667-680.

368. Briley-Saebo KC, Mulder WJM, Mani V, et al. Magnetic resonance imaging of vulnerable atherosclerotic plaques: current imaging strategies and molecular imaging probes. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 26:460-479.
369. Choudhury RP, Fuster V, Fayad ZA. Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nat Rev Drugs Discov*. 2004; 3(11):913-925.
370. Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Molecular imaging of cardiovascular disease. *Circulation*. 2007; 116:1052-1061.
371. Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R. Molecular magnetic resonance imaging in cardiovascular medicine. *Circulation*. 2007; 115:2076-2086.
372. Leuschner F, Nahrendorf M. Molecular imaging of coronary atherosclerosis and myocardial infarction: considerations for the bench and perspectives for the clinic. *Circ Res*. 2011; 108(5):593-606.
373. Wildgruber M, Swirski FK, Zerneck A. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis. *Theranostics*. 2013; 3(11):865-884.
374. Mulder WJ, Jaffer FA, Fayad ZA, et al. Imaging and nanomedicine in inflammatory atherosclerosis. *Sci Transl Med*. 2014; 6(239):239sr1.
375. Camici PG, Rimoldi OE, Gaemperli O, et al. Non-invasive anatomic and functional imaging of vascular inflammation and unstable plaque. *Eur Heart J*. 2012; 33:1309-1317.
376. Quillard T, Libby P. Molecular imaging of atherosclerosis for improving diagnostic and therapeutic development. *Circ Res*. 2012; 111:231-244.
377. Broisat A, Toczek J, Dumas LS, et al. <sup>99m</sup>Tc-cAbVCAM1-5 imaging is a sensitive and reproducible tool for the detection of inflamed atherosclerotic lesions in mice. *J Nucl Med*. 2014; 55(10):678-684.
378. Nahrendorf M, Keliher E, Panizzi P, et al. <sup>18</sup>F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009; 2(10):1213-1222.
379. Kaufmann BA, Sanders JM, Davis C, et al. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation*. 2007; 116:276-284.
380. Nahrendorf M, Jaffer FA, Kelly KA, et al. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*. 2006; 114:1504-1511.

381. Broisat A, Riou LM, Ardisson V, et al. Molecular imaging of vascular cell adhesion molecule-1 expression in experimental atherosclerotic plaques with radiolabelled B2702-p. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007; 34(6):830-840.
382. Villanueva FS, Jankowski RJ, Klivanov S, et al. Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1 bind to activated coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 1998; 98:1-5.
383. Demos SM, Alkan-Onyuksel H, Kane BJ, et al. In vivo targeting of acoustically reflective liposomes for intravascular and transvascular ultrasonic enhancement. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 33:867-875.
384. Nakamura I, Hasegawa K, Wada Y, et al. Detection of early stage atherosclerotic plaques using PET and CT fusion imaging targeting P-selectin in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 433(1):47-51.
385. Jefferson A, Wijesurendra RS, McAteer MA, et al. Molecular imaging with optical coherence tomography using ligand-conjugated microparticles that detect activated endothelial cells: rational design through target quantification. *Atherosclerosis*. 2011; 219:579-587.
386. Pello OM, Silvestre C, De Pizzol M, et al. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology*. 2011; 216(11):1172-1176.
387. Ogawa M, Nakamura S, Saito Y, et al. What can be seen by 18F-FDG PET in atherosclerosis imaging? The effect of foam cell formation on 1F-FDG uptake to macrophages in vitro. *J Nucl Med*. 2012; 53(1):55-58.
388. Lederman RJ, Raylman RR, Fisher SJ, et al. Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 19-fluorodeoxyglucose (FDG). *Nucl Med Commun*. 2001; 22(7):747-753.
389. Tawakol A, Migrino RQ, Hoffmann U, et al. Noninvasive in vivo measurement of vascular inflammation with F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Nucl Cardiol*. 2005; 12:294-301.
390. Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, et al. Imaging atherosclerosis plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation*. 2002; 105(23):2708-2711.

391. Tawakol A, Migrino RQ, Bashian GG, et al. In vivo  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(9):1818-1824.
392. Dunphy M, Freiman A, Larson SM, et al. Association of vascular  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake with vascular calcification. *J Nucl Med*. 2005; 46(8):1278-1284.
393. Bural GG, Torigian DA, Chamroonrat W, et al. FDG-PET is an effective imaging modality to detect and quantify age-related atherosclerosis in large arteries. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008; 35(3):562-569.
394. Yoo HJ, Kim S, Park MS, et al. Vascular inflammation stratified by C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels: analysis with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET. *J Nucl Med*. 2011; 52(1):10-17.
395. Wu YW, Kao HL, Chen MF, et al. Characterization of plaques using  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT in patients with carotid atherosclerosis and correlation with matrix metalloproteinase-1. *J Nucl Med*. 2007; 48(2):227-233.
396. Graebe M, Pedersen SF, Hojgaard L, et al.  $^{18}\text{F}$ -FDG PET and ultrasound echolucency in carotid artery plaques. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010; 3(3):289-295.
397. Liu Y, Pierce R, Luehmann HP, et al. PET imaging of chemokine receptors in vascular injury atherosclerosis. *J Nuc Med*. 2013; 54(7):1135-1141.
398. Luehmann HP, Pressly ED, Detering L, et al. PET/CT imaging of chemokine receptor CCR5 in vascular injury model using targeted nanoparticle. *J Nucl Med*. 2014; 55(4):629-634.
399. Ohtsuki K, Hayase M, Akashi K, et al. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions: an autoradiographic study. *Circulation*. 2001; 104(2):203-208.
400. Robb RJ, Greene WC, Rusk CM. Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. Implications for the level of Tac antigen. *J Exp Med*. 1984; 160(4):1126-1146.
401. Annovazzi A, Bonanno E, Arca M, et al.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -interleukin-2 scintigraphy for the in vivo imaging of vulnerable atherosclerotic plaques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006; 33(2):117-126.

402. Glaudemans AW, Bonanno E, Galli, F et al. In vivo and in vitro evidence that <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-interleukin-2 is able to detect T lymphocytes in vulnerable atherosclerotic plaques of the carotid arteries. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014; 41(9):1710-1719.
403. Ishino S, Mukai T, Kuge Y, et al. Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) with <sup>99m</sup>Tc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque. *J Nucl Med*. 2008; 49(10):1677-1685.
404. Langer HF, Haubner R, Pichler BJ, et al. Radionuclide imaging: a molecular key to the atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52:1-12.
405. Armani C, Catalani E, Balbarini A, et al. Expression, pharmacology, and functional role of somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human macrophages. *J Leukoc Biol*. 2006; 81(3):845-555.
406. Dalm VA, van Hagen PM, van Koesveld PM, et al. Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285(2):E344-E353.
407. Rominger A, Saam T, Vogl E, et al. In vivo imaging of macrophage activity in the coronary arteries using <sup>68</sup>Ga-DOTATATE PET/CT: correlation with coronary calcium burden and risk factors. *J Nucl Med*. 2010; 51(2):193-197.
408. Li X, Samnick S, Lapa C, et al. <sup>68</sup>Ga-DOTATATE PET/CT for the detection of inflammation of large arteries: correlation with <sup>18</sup>F-FDG, calcium burden and risk factors. *EJNMMI Res*. 2012; 2(1):52.
409. Bird JL, Izquierdo-Garcia D, Davies JR, et al. Evaluation of translocator protein quantification as a tool for characterising macrophage burden in human carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010; 210(2):388-391.
410. Gaemperli O, Shalhoub J, Owen DR, et al. Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with <sup>11c</sup>-PK1195 positron emission tomography/computed tomography. *Eur Heart J*. 2012; 33(15):1902-1910.
411. Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 2009; 50(Suppl.):S282-S286.
412. Chang MY, Lees AM, Lees RS. Time course of <sup>125</sup>I-labeled LDL accumulation in the healing, balloon-deendothelialized rabbit aorta. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12:1088-1098.

413. Lees AM, Lees RS, Schoen FJ, et al. Imaging human atherosclerosis with 99m-Tc-labeled low density lipoproteins. *Arteriosclerosis*. 1988; 8(5):461-470.
414. Virgolini I, Rauscha F, Lupattelli G, et al. Autologous low-density lipoprotein labelling allows characterization of human atherosclerotic lesions in vivo as to presence of foam cells and endothelial coverage. *Eur J Nucl Med*. 1991; 18(12):948-951.
415. Iuliano L, Signore A, Vallabajosula S, et al. Preparation and biodistribution of 99m-technetium labelled oxidized LDL in man. *Atherosclerosis*. 1996; 126(1):131-141.
416. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(1):333-337.
417. Schafers M, Riemann B, Kopka K, et al. Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo. *Circulation*. 2004; 109(21):2554-2559.
418. Jaffer FA, Kim DE, Quinti L, et al. Optical visualization of cathepsin K activity in atherosclerosis with a novel, protease-activatable fluorescence sensor. *Circulation*. 2007; 115(17):2292-2298.
419. Barkhausen J, Ebert W, Heyer C, et al. Detection of atherosclerotic plaque with gadofluorine-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003; 108:605-609.
420. Johnson LL, Schofield L, Donahay T, et al. 99mTc-annexin V imaging for in vivo detection of atherosclerotic lesions in porcine coronary arteries. *J Nucl Med*. 2005; 46(7):1186-1193.
421. Kolodgie FD, Petrov A, Virmani R, et al. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation*. 2003; 108(25):3134-3139.
422. Ishino S, Kuge Y, Takai N, et al. 99mTc-annexin a5 for noninvasive characterization of atherosclerotic lesions: imaging and histological studies in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007; 34(6):889-899.
423. Kietselaer BL, Reutelingsperger CP, Heidendal GA, et al. Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2004; 350(14):1472-1473.

424. Razavian M, Marfatia R, Mongue-Din H, et al. Integrin-targeted imaging of inflammation in vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(12):2820-2826.
425. Paeng JC, Lee YS, Lee JS, et al. Feasibility and kinetic characteristics of (68)Ga-NOTA-RGD PET for in vivo atherosclerosis imaging. *Ann Nucl Med.* 2013; 27(9):847-854.
426. Golestani R, Zeebregts CJ, Terwisscha van Scheltinga AG, et al. Feasibility of vascular endothelial growth factor imaging in human atherosclerotic plaque using (89)Zr-bevacizumab positron emission tomography. *Mol Imaging.* 2013; 12(4):235-243.
427. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, et al. 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. *Lancet.* 2014; 383(9918):705-713.
428. Uppal R, Catana C, Ay I, et al. Bimodal thrombus imaging: simultaneous PET/MR imaging with a fibrin-targeted dual PET/MR probe: feasibility study in rat model. *Radiology.* 2011 ;258(3):812-820.
429. Vymazal J, Spuentrup E, Cardenas-Molina G, et al. Thrombus imaging with fibrin-specific gadolinium-based MR contrast agent ep-2104r: results of a phase II clinical study of feasibility. *Invest Radiol.* 2009; 44:697-704.
430. Bates SM, Lister-James J, Julian JA, et al. Imaging characteristics of a novel technetium Tc 99m-labeled platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist in patients with acute deep vein thrombosis or a history of deep vein thrombosis. *Arch Intern Med.* 2003; 163:452-456.
431. Calamante F, Tournier JD, Kurniawan ND, et al. Super-resolution track-density imaging studies of mouse brain: comparison to histology. *Neuroimage.* 2012; 59(1):286-296.
432. Fleming CP, Ripplinger CM, Webb B, et al. Quantification of cardiac fiber orientation using optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2008; 13(3):030505.
433. Georgen CJ, Chen HH, Sakadzic S, et al. Microstructural characterization of myocardial infarction with optical coherence tomography and two-photon microscopy. *Physiol Rep.* 2016; 4(18):e12894.
434. Lefebvre J, Castonguay A, Pouliot P, et al. Whole mouse brain imaging using optical coherence tomography: reconstruction, normalization segmentation, and comparison with diffusion MRI. *Neurophotonics.* 2017; 4(4):041501.

435. Castonguay A, Lefebvre J, Pouliot P, et al. Serial optical coherence scanning reveals an association between cardiac function and the heart architecture in the aging rodent heart. *Biomed Opt Express*. 2017; 8(11):5027-5038.
436. Wang H, Zhu J, Akkin T. Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *Neuroimage*. 2014; 84:1007-1017.
437. Castonguay A, Avti PK, Moeini M, et al. Investigating the correlation between white matter and microvasculature in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. *Proc SPIE*. 2015; 9328.
438. Tardif PL, Bertrand MJ, Abran M, et al. Validating intravascular imaging with serial optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:2110.
439. Khamis RY, Woollard KJ, Hyde GD, et al. Near infrared fluorescence (NIRF) molecular imaging of oxidized LDL with an autoantibody in experimental atherosclerosis. *Sci Rep*. 2016; 6:21785.
440. Baral TN, MacKenzie R, Arbabi Ghahroudi M. Single-domain antibodies and their utilities. *Curr Protoc Immunol*. 2013; 103:Unit 2.17.
441. Saraf S, Ong PJJ, Gorog DA. ClearWay™ RX – Rapid exchange therapeutic perfusion catheter. *Eurointervention*. 2008; 3:639-642.
442. Kaminura R, Suzuki S, Sakamoto H, et al. Development of atherosclerotic lesions in cholesterol-loaded rabbits. *Ex Anim*. 1999; 48:1-7.
443. Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, et al. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis*. 1993; 102:9-22.
444. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, et al. Animal models in cardiovascular disease. *J Biomed Biotech*. 2011; 2011:497841.
445. Okabe T, Hoshiga M, Negoro N, et al. Rabbit plaque models closely resembling lesions in human coronary artery disease. *Intern J Cardiol*. 2011; 147:271-277.
446. Phinikaridou A, Hallock KJ, Qiao Y, et al. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis. *J Lipid Res*. 2009; 50:787-797.

447. Granada JF, Kaluza GL, Wilensky RL, et al. Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *EuroIntervention*. 2009; 5:140-148.
448. Vilahur G, Padro T, Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models. *J Biomed Biotech*. 2011; 2011:907575.
449. Liedtke AJ, Hughes HC, Neely JR. An experimental model for studying myocardial ischemia. Correlation of hemodynamic performance and metabolism in the working swine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1975; 69(2):203-211.
450. Skold BH, Getty R, Ramsey FK. Spontaneous atherosclerosis in the arterial wall system of aging swine. *Am J Vet Res*. 1966; 27(116):257-273.
451. Reiser R, sorrels MF, Williams MC. Influence of high levels of dietary fats and cholesterol on atherosclerosis and lipid distribution in swine. *Circ Res*. 1959; 7:833-846.
452. Casani L, Sanchez-Gomez S, Vilahur G, et al. Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering. *Thromb Haemost*. 2005; 94(5):1035-1041.
453. Jorgensen L. The role of platelets in the initial stages of atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(7):1443-449.
454. Hamamdzic D, Wilensky RL. Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis: role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *J Diabetic Res*. 2013; 2013:7814145.
455. Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, et al. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes*. 2001; 50:1654-1665.
456. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, et al. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation*. 2003; 108(4):472-478.
457. Mohler ER III, Sarov-Blat L, Shi Y, et al. Site-specific atherogenic gene expression correlates with subsequent variable lesion development in coronary and peripheral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:850-855.
458. Wang YX, Fitch R, Li W, et al. Reduction of cardiac function reserve and elevation of aortic stiffness in hyperlipidemic Yucatan minipigs with systemic and coronary atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2002; 39(1-2):69-76.
459. Dixon JL, Stoops JD, Parker JL, et al. Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:2981-2992.

460. van Ditzhuijzen NS, van den Heuvel M, Sorop O, et al. Serial coronary imaging of early atherosclerosis development in fast-food-fed diabetic and nondiabetic swine. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science*. 2016; 1:449-460.
461. Duff GL, Mc MG. The effect of alloxan diabetes on experimental cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *J Exp Med*. 1949; 89:611-630.
462. Taki H, Kashiwagi A, Tanaka Y, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via an osmotic effect in human umbilical vein endothelial cells exposed to high glucose medium. *Life Sci*. 1996; 58:1713-1721.
463. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest*. 1994; 70:1380-151.
464. Renier G, Desfaits AC, Serri O. Effect of gliclazide on monocyte-endothelium interactions in diabetes. *J Diabetes Complications*. 2000; 14(4):215-223.
465. Verjans JW, Osborn EA, Ughi GJ, et al. Targeted near-infrared fluorescence imaging of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol Imaging*. 2016; 9:1087-1095.

# ANNEXE 1

Doses d'insuline NPH sous-cutanée à administrer selon les glycémies capillaires (TECH-P-34)

Valeurs cibles = **17.0 – 25.0 mmol/l**

	Valeurs de glycémie	Unités d'insuline
<b>AM</b> (8h)	<b>LOW</b>	0 Unité + ½ ampoule D50% appeler vétérinaire ou MJB
	< 4.0	0 Unité + ½ ampoule D50% refaire glycémie dans 2 heures
	4.1 - 10.0	0 Unité
	10.1 - 17.0	Diminuer de ½ dose usuelle
	17.1 - 27.0	Dose usuelle de l'animal
	27.1 - 32.0	Augmenter de 3 Unités
	<b>HIGH</b>	appeler vétérinaire ou MJB pour dose à déterminer mettre NaCl 0.9% à 80 cc/h x 2 heures
<b>PM</b> (16h)	<b>LOW</b>	0 Unité + ½ ampoule D50% appeler vétérinaire ou MJB
	< 4.0	0 Unité + ½ ampoule D50% refaire glycémie dans 2 heures
	4.1 - 10.0	0 Unité
	10.1 - 17.0	Diminuer de ½ dose usuelle
	17.1 - 27.0	Dose usuelle de l'animal
	27.1 - 32.0	Augmenter de 3 Unités
	<b>HIGH</b>	appeler vétérinaire ou MJB et administrer 4 Unités insuline R (rapide) – <b>gluco q 30 min</b>



Pour tous changements dans le comportement de l'animal ou l'état d'éveil, niveau de glycémie à LOW ou HIGH: appelez immédiatement l'une des personnes suivantes :

- **Dr André-François Couture**, vétérinaire : #2456
- **Marie-Jeanne Bertrand** (en charge du projet) : #3206 ;

**NB** : 1 mg/dl (valeurs US) = 0.0555 mmol/l ; 1 mmol/l = 18.02 mg/dl