

Université de Sherbrooke

Développement d'outils quantitatifs pour le suivi par imagerie
TEP/TDM de la réponse à la chimiothérapie et de sa toxicité

Par
Etienne Croteau
Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D)
en Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada

6 août 2011

Évaluateurs :

- Pr. Martin Lepage, Président de jury, Médecine nucléaire et radiobiologie
- Pr. Eric Turcotte, Évaluateur interne au programme, Médecine nucléaire et radiobiologie
- Pr. André C. Carpentier, Évaluateur externe au programme, Service d'endocrinologie
- Pr. Rob Beanlands, Évaluateur externe à l'Université, Département de radiologie, Université d'Ottawa
- Pr. Roger Lecomte, Co-directeur, Médecine nucléaire et radiobiologie
- Pr. François Bénard, Co-directeur, Médecine nucléaire et radiobiologie

Développement d'outils quantitatifs pour le suivi par imagerie
TEP/TDM de la réponse à la chimiothérapie et de sa toxicité
Par
Etienne Croteau
Programme de Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme Philosophiae Doctor (Ph.D.) en sciences des radiations et imagerie biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Résumé

L'objectif de ce projet de doctorat est de développer des outils quantitatifs pour le suivi des traitements de chimiothérapie pour le cancer du sein et de leurs effets cardiotoxiques à l'aide de l'imagerie TEP dynamique. L'analyse cinétique en TEP dynamique permet l'évaluation de paramètres biologiques *in vivo*. Cette analyse peut être utilisée pour caractériser la réponse tumorale à la chimiothérapie et les effets secondaires néfastes qui peuvent en résulter.

Le premier article de cette thèse décrit la mise au point des techniques d'analyse cinétique qui utilisent la fonction d'entrée d'un radiotracer dérivé de l'image dynamique. Des corrections de contamination radioactive externe (épanchement) et de l'effet de volume partiel ont été nécessaires pour standardiser l'analyse cinétique et la rendre quantitative.

Le deuxième article porte sur l'évaluation d'un nouveau radiotracer myocardique. Le ^{11}C -acétoacétate, un nouveau radiotracer basé sur un corps cétonique, a été comparé au ^{11}C -acétate, couramment utilisé en imagerie cardiaque TEP. L'utilisation de ^3H -acétate et ^{14}C -acétoacétate ont permis d'élucider la cinétique de ces traceurs depuis la fonction d'entrée et la captation par les mitochondries cardiaques qui reflète la consommation en oxygène, jusqu'à la libération de leurs principaux métabolites réciproques ($^3\text{H}_2\text{O}$ et $^{14}\text{CO}_2$).

Le troisième et dernier article de cette thèse présente l'intégration d'un modèle qui évalue la réserve cardiaque de perfusion et de consommation en oxygène. Un modèle de cardiomyopathie a été établi à l'aide d'un agent chimiothérapeutique contre le cancer du sein, la doxorubicine, reconnu comme étant cardiotoxique. Un protocole de repos/effort a permis d'évaluer la capacité d'augmentation de perfusion et de consommation en oxygène par le cœur. La démonstration d'une réserve cardiaque réduite caractérise la cardiotoxicité.

La dernière contribution de cette thèse porte sur la mise au point de méthodes peu invasives pour mesurer la fonction d'entrée en modèle animal avec l'utilisation de l'artère caudale et un compteur microvolumétrique, la bi-modalité TEP/IRM dynamique avec le Gd-DTPA et l'établissement d'un modèle d'évaluation simultané de cardiotoxicité et réponse tumorale chez la souris.

Le développement d'outils d'analyse TEP dans l'évaluation de la cardiotoxicité lors de traitements du cancer du sein permet de mieux comprendre la relation entre les dommages mitochondriaux et la diminution de la fraction d'éjection.

Mots clés : Tomographie d'émission par positrons (TEP), analyses cinétiques, ^{11}C -acétate, ^{11}C -acétoacétate, cardiotoxicité.

L'important dans la vie, c'est d'être heureux

À toi Chantal, ma conjointe, qui m'a épaulé durant toutes ces longues journées, soirées et nuits.
Toujours présente, année après année.

À toi, Alexandre aux yeux brillants, toujours curieux, qui vient me voir travailler à mon bureau et repart ensuite.

À toi, Juliette, venue voir défiler les mots sur l'écran et prendre une petite parcelle de temps avec moi.

Table des matières

Résumé	II
Introduction	1
Chapitre 1.	Notions de base.....	5
Chapitre 1.1.	Les principes de la TEP	5
Chapitre 1.1.1.	L'effet de volume partiel	7
Chapitre 1.1.2.	L'effet de contamination radioactive externe (épanchement)	9
Chapitre 1.2.	L'analyse cinétique des images TEP dynamiques	11
Chapitre 1.2.1.	La fonction d'entrée	12
Chapitre 1.2.2.	L'analyse graphique	13
Chapitre 1.2.3.	L'analyse compartimentale	14
Chapitre 1.3.	Le métabolisme énergétique du cœur	17
Chapitre 1.3.1.	Le métabolisme des hydrates de carbone	18
Chapitre 1.3.2.	Le métabolisme des acides gras	20
Chapitre 1.3.3.	L'acétate et l'acétoacétate, des corps cétoniques	21
Chapitre 1.4.	L'insuffisance cardiaque	22
Chapitre 1.4.1.	La cardiomyopathie induite par la doxorubicine, une anthracycline	24
Chapitre 1.5.	Problématiques et hypothèses de recherche	27
Chapitre 2.	Article (1) : Image-derived input function in dynamic human PET/CT: methodology and validation with ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ^{18}F -fluorodeoxyglucose in brain.....	30
Chapitre 2.1.	Résumé de l'article en français	31
Chapitre 2.2.	Texte de l'article	33
Chapitre 2.3.	Réponses (en anglais) aux questions de l'évaluateur externe concernant l'article (1)	74
Chapitre 3.	Article (2) : ^{11}C -Acetoacetate - a new PET tracer of myocardial function	82
Chapitre 3.1.	Résumé de l'article en français	83
Chapitre 3.2.	Texte de l'article	84

Chapitre 3.3.	Article (2) amendé : ^{11}C -Acetoacetate - a new PET tracer of myocardial function (modification de la rationnelle)	118
Chapitre 3.3.1.	Résumé de l'article en français	118
Chapitre 3.3.2.	Texte de l'article	120
Chapitre 3.4.	Réponses (en anglais) aux questions de l'évaluateur externe concernant l'article (2) et l'article (2) amendé	150
Chapitre 4.	Article (3) : ^{11}C -Acetate rest-stress protocol to assess myocardial perfusion and oxygen consumption reserve in a model of congestive heart failure in rats	155
Chapitre 4.1.	Résumé de l'article en français	156
Chapitre 4.2.	Texte de l'article	157
Chapitre 4.3.	Réponses (en anglais) aux questions de l'évaluateur externe concernant l'article (3)	184
Chapitre 5.	Autres travaux réalisés dans le cadre de cette thèse	187
Chapitre 5.1.	Fonction d'entrée artérielle chez le rat sans chirurgie	189
Chapitre 5.2.	Utilisation de la fonction d'entrée Gd-DTPA en IRM dans l'analyse pharmacocinétique en TEP ^{18}F -FDG	200
Chapitre 5.3.	Évaluation simultanée de la réponse tumorale aux traitements à la doxorubicine et de son impact cardiotoxique chez la souris	205
Chapitre 6.	Discussion	210
Chapitre 6.1.	Les objectifs précliniques	212
Chapitre 6.1.1.	Les modèles animaux pour la recherche en TEP	214
Chapitre 6.1.2.	Les agents cardioprotecteurs	215
Chapitre 6.2.	Les objectifs cliniques	216
Chapitre 7.	Conclusion	218
Remerciements	221
Références bibliographiques	222
Annexe I	233
Annexe II	234
Annexe III	236

Liste des figures :

Figure 1.1	Principe de la tomographie d'émission par positrons	5
Figure 1.2	Effet de volume partiel, représentation de l'objet et de l'image en tomographie d'émission par positrons	8
Figure 1.3	Effet de contamination externe (épanchement), représentation de l'objet et de l'image en tomographie d'émission par positrons	10
Figure 1.4	Analyse graphique de type Patlak, données brutes (A) et analyse Patlak (B)	14
Figure 1.5	Modèle compartimental, schématisation de l'analyse compartimentale.....	16
Figure 1.6	Régulation de l'oxydation du glucose, voie de la régulation de l'oxydation du glucose par les cellules myocardiques	19
Figure 1.7	Métabolisme des acides gras, voie du métabolisme des acides gras par les cellules myocardiques	21
Figure 1.8	Cardiotoxicité de la doxorubicine, voie d'action de la doxorubicine sur les cellules myocardiques	26
Article 1 :	Image-derived input function in dynamic human PET/CT: methodology and validation with ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ^{18}F -fluorodeoxyglucose in brain	
Figure 1	Graphiques des résultats de mires et des équations de l'effet du volume partiel et d'épanchement	40
Figure 2	Corrélation du profil de largeur à mi-hauteur de l'image TEP et des diamètres réels des objets à l'intérieur de la mire	42
Figure 3	Courbes d'activité dans le temps des fonctions d'entrée dérivées de l'image corrigée ou non et des prélèvements pour le ^{18}F -FTHA et ^{18}F -FDG	45
Figure 4	Résultats de l'indice de perfusion (K_1) par analyse compartimentale au ^{11}C -acétate et corrélation des résultats entre l'IDIF et les prélèvements sanguins	55

Figure 5	Résultats de l'indice de captation (K_i) par analyse graphique de type Patlak au ^{18}F -FTHA et corrélation des résultats entre l'IDIF et les prélèvements sanguins.	57
Figure 6	Résultats de l'analyse compartimentale du taux métabolique cérébral du glucose au ^{18}F -FDG et corrélation des résultats entre l'IDIF et les prélèvements sanguins	59
Article 2 :	^{11}C -Acetoacetate - a new PET tracer of myocardial function	
Figure 1	Schéma des voies métaboliques myocardiques de l'acétoacétate et l'acétate	88
Figure 2	Exemple du ^{11}C -acétoacétate et du ^{11}C -acétate, A) images télé-diastoliques et télé-systoliques, B) résultats de la fonction myocardique	92
Figure 3	Exemple du ^{11}C -acétoacétate et du ^{11}C -acétate. Courbes de radioactivité dans le temps de la fonction d'entrée, la fonction d'entrée corrigé pour la présence des métabolites et la courbe du myocarde.	94
Figure 4	Résultats des fonctions ventriculaires cardiaques du ^{11}C -acétoacétate et du ^{11}C -acétate A) télé-diastolique, B) télé-systolique et C) fraction d'éjection ventriculaire gauche. D) Graphique Bland-Altman de la différence en pourcentage des radiotraceurs.....	99
Figure 5	Courbe de radioactivité sanguine dans le temps du groupe de validation du ^{14}C -acétoacétate et du ^3H -acétate, A) Données brutes, B) ^{14}C - CO_2 et du ^3H - H_2O et C) ^{14}C -acétoacétate et du ^3H -acétate corrigé pour la présence de leurs métabolites.	102
Figure 6	Résultats de la perfusion myocardique du ^{11}C -acétoacétate et du ^{11}C -acétate. A) Corrélation entre l'analyse compartimentale à 3-compartiments et l'analyse à 2-compartiments. B) Graphique Bland-Altman de la différence en pourcentage entre les deux méthodes. Corrélation entre le ^{11}C -acétoacétate et le ^{11}C -acétate C) analyse à 3-compartiments, D) analyse à 2-compartiments	104
Figure 7	Résultats de la consommation en oxygène par le myocarde au ^{11}C -acétoacétate et au ^{11}C -acétate. A) Corrélation entre l'analyse compartimentale à 3-compartiments et l'analyse par équation mono-exponentielle. B) Graphique Bland-Altman de la différence en pourcentage entre les deux méthodes d'analyses. Corrélation entre le	

	^{11}C -acétoacétate et le ^{11}C -acétate C) de l'analyse à 3-compartiments, et D) de l'analyse par équation mono-exponentielle	106
Article 2 :	^{11}C -Acetoacetate - a new PET tracer of myocardial function (Amendé)	
Figure 1	Schéma des voies métaboliques myocardiques de l'acétoacétate	124
Figure 2	Exemple du ^{11}C -acétoacétate chez le rat contrôle et traité à la doxorubicine. A) Images télé-diastoliques et télé-systoliques. B) Courbe des volumes ventriculaire gauche lors d'un battement cardiaque	128
Figure 3	Courbe du ^{11}C -acétoacétate dans le temps de la fonction d'entrée, courbe de la fonction d'entrée corrigé pour la présence des métabolites et la courbe du myocarde chez les rats contrôles et traités	130
Figure 4	Résultats de la fonction cardiaque ventriculaire gauche du ^{11}C -acétoacétate. A) télé-diastolique, B) télé-systolique et C) fraction d'éjection	134
Figure 5	Courbe de radioactivité sanguine dans le temps du groupe de validation du ^{14}C -acétoacétate, A) Données brutes, B) ^{14}C -CO ₂ et C) ^{14}C -acétoacétate corrigé pour la présence des métabolites ^{14}C -CO ₂	137
Figure 6	Résultats de la perfusion myocardique (MPI) du ^{11}C -acétoacétate A) Corrélation entre l'analyse compartimentale à 3-compartiments et l'analyse à 2-compartiments. B) Graphique Bland-Altman de la différence entre les méthodes d'analyses	138
Figure 7	Résultats de l'estimation indirecte de la consommation en oxygène par le myocarde au ^{11}C -acétoacétate. Corrélation entre l'analyse compartimentale à 3-compartiments et l'analyse par équation mono-exponentielle	140
Article 3 :	^{11}C -Acetate rest-stress protocol to assess myocardial perfusion and oxygen consumption reserve in a model of congestive heart failure in rats	
Figure 1	Exemple de correction de l'activité résiduelle du protocole repos/effort (A). Courbe de radioactivité dans le temps de la fonction d'entrée et du myocarde (B) et image de repos/effort au ^{11}C -acétate (C)	164

Figure 2	Résultats de perfusion et de consommation d'oxygène par le myocarde du groupe de validation de l'examen repos/stimulation au ^{11}C -acétate	169
Figure 3	Corrélation de la perfusion myocardique et de la consommation en oxygène du myocarde (A). Corrélation de la consommation en oxygène avec le ^{11}C -acétate et le produit du rythme cardiaque avec la pression systolique (RPP) (B)	171
Figure 4	Résultats de perfusion, de consommation d'oxygène et de réserve du myocarde pour les groupes contrôles et traités à la doxorubicine de l'examen repos/effort au ^{11}C -acétate	173

Autres travaux réalisés dans le cadre de cette thèse

Figure 5.1.1	Graphique de la fonction d'entrée obtenue par l'artère caudale chez le rat au ^{18}F -FDG par prélèvement manuel et par compteur microvolumétrique, non corrigé et corrigé pour l'effet de dispersion	192
Figure 5.1.2	Graphique de la détermination des constantes a et s de l'équation décrite pour la correction de la portion de l'injection de la fonction d'entrée obtenue par MBC	194
Figure 5.1.3	Graphique de la fonction d'entrée par l'artère caudale chez le rat au ^{18}F -FDG obtenue manuellement et par MBC corrigé pour la dispersion	195
Figure 5.1.4	Diagramme de dispersion du taux métabolique de consommation du glucose cardiaque (MMRG) analysé par les fonctions d'entrée obtenues simultanément par l'artère caudale et l'artère fémorale	196
Figure 5.1.5	Diagramme de dispersion du taux métabolique de consommation du glucose cardiaque (MMRG) analysé par la fonction d'entrée obtenue par l'artère caudale en prélèvement manuel et par le MBC ainsi que par l'artère fémorale avec MBC	196
Figure 5.1.6	Graphique du taux métabolique de consommation du glucose cardiaque (MMRG) avec la fonction d'entrée lors de prélèvements double simultané ou simple	197

Figure 5.2.1	Représentation graphique de la fonction d'entrée de l'injection d'un radiotracer dans un système biologique	201
Figure 5.2.2	Graphique de la conversion de la fonction d'entrée obtenue par l'agent de contraste Gd-DTPA transformé en fonction d'entrée en ^{18}F -FDG et vice versa	202
Figure 5.2.3	Diagramme de dispersion du taux métabolique de consommation du glucose cardiaque (MMRG) des fonctions d'entrée obtenues manuellement avec le Gd-DTPA convertie en ^{18}F -FDG, ^{18}F -FDG manuel et ^{18}F -FDG obtenu à partir du modèle mathématique	203
Figure 5.3.1	Réponse tumorale, graphique de représentation de la croissance des volumes tumoraux et de leurs activités glycolytiques tumorales dans le temps chez la souris traitée à la doxorubicine	206
Figure 5.3.2	Réponse myocardique, graphique de l'activité glycolytique myocardique, de la perfusion et de la consommation en oxygène dans le temps chez la souris traitée à la doxorubicine	207
Figure 5.3.3	Fonction cardiaque, graphique de la fonction cardiaque au ^{18}F -FDG chez la souris traitée à la doxorubicine	208

Liste des abréviations :

ACC:	Acétyl-CoA carboxylase
ADP:	Adénosine diphosphate
AGL:	Acides gras libres
AMPK:	AMP-activé par protéine kinase
ATP:	Adénosine triphosphate
Bq :	Becquerel
CPT I:	Carnitine palmitoyl transférase
FDG:	Fluorodésoxyglucose
FTHA:	Acide fluoro thia-heptadécanoïde
FACS:	Acyl-CoA synthétase des acides gras (« Fatty-acyl-CoA synthase »)
Gd-DTPA:	Gadolinium- DTPA
HER-2:	Récepteur pour les facteurs de croissance épidermaux humains (« Human epidermal growth factor receptor »)
ICPMS :	Spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
IRP :	Protéine régulatrice de fer (« Iron regulatory protein »)
K_i :	Constante de taux d'entrée
MBC :	Compteur sanguin microvolumétrique (« Microvolumetric blood counter »)
MFES:	Méthoxy-fluoro-oestradiol
NAD ⁺ :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH:	Nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite
NH ₃ :	Ammoniac
PARP	Poly-ADP-ribose-polymérase
PDH:	Pyruvate déshydrogénases
ROS:	Dérivés réactifs de l'oxygène (« Reactive oxygen species »)
SOD:	Superoxyde dismutase
SUV:	Valeur standardisée de captation (« Standardized Uptake Value »)
TDM:	Tomodensitométrie
TEM :	Tomographie d'émission monophotonique
TEP :	Tomographie d'émission par positrons
TfR:	Récepteur de transferrine

Introduction

La population se faisant vieillissante, le système de santé est de plus en plus sollicité. Selon les statistiques canadiennes les plus récentes, le cancer est la première cause de décès avant l'âge de 65 ans. Environ 45% des Canadiens en seront atteints au cours de leur vie. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les Canadiennes. Une Canadienne sur neuf (11%) en sera atteinte au cours de sa vie. Les maladies du cœur et les accidents vasculaires cérébraux représentent les deux autres causes principales de décès au Canada. Les coûts des soins de santé publics en 2008-2009 sont estimés à 121,6 milliards de dollars.

En oncologie, avec le développement d'outils diagnostiques de plus en plus performants depuis une vingtaine d'années, les programmes de dépistage précoce du cancer du sein (Kreutzkamp, 2005) et de la prostate (Bouchardy et al., 2008) ont permis d'augmenter de façon significative le taux de survie lors d'un diagnostic de cancer.

Les outils d'évaluation du cancer ne se limitent plus seulement à évaluer la dimension des foyers tumoraux en régression, stabilisés ou en progression. Nous sommes maintenant intéressés à connaître l'intégrité membranaire, la perméabilité membranaire et l'activité métabolique des cellules tumorales (Checkley et al., 2003; Dunnwald et al., 2008; Escudier et al., 2008; Evelhoch et al., 2004). Nous voulons également quantifier la division cellulaire, l'expression ou la surexpression de facteurs angiogéniques et apoptotiques, voire identifier les récepteurs tumoraux spécifiques. La caractérisation des foyers tumoraux contribue à l'avancement en recherche sur les traitements oncologiques et augmente la qualité des examens diagnostiques pour le médecin traitant.

De même, l'imagerie médicale a vu son rôle prendre de plus en plus d'importance dans le diagnostic et le suivi des cancers. Lors des bilans d'investigation de base dans la suspicion d'un cancer, la biopsie ainsi que les résultats pathologiques et biochimiques se conjuguent aux examens d'imagerie pour mieux documenter l'état et l'étendue de la maladie, et ainsi assurer une meilleure action des traitements oncologiques. L'imagerie multimodale en oncologie (de Langen et al., 2008; Eby et al., 2008; Mankoff, 2008) exploitant la tomодensitométrie (TDM), la

tomographie d'émission monophotonique (TEM), la tomographie d'émission par positrons (TEP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'échographie en oncologie permettent d'améliorer l'investigation d'un bilan de base ou du suivi de la maladie. L'un des sujets de recherche en imagerie multimodale TEP/IRM préclinique dans notre département porte sur la combinaison des informations complémentaires issues de chaque modalité. Nous voulons démontrer que la fonction d'entrée mesurée expérimentalement, qu'elle provienne de la TEP avec le ^{18}F -FDG ou de l'IRM avec l'agent de contraste gadolinium-DTPA, peut être utilisée dans l'analyse cinétique de la consommation du glucose une fois transformée adéquatement (annexe II).

La recherche en imagerie moléculaire a le potentiel de créer de nouveaux outils pour détecter des maladies à des stades moins avancés. Cette détection précoce pourrait résulter en une réduction des coûts liés aux complications d'une détection plus tardive de la maladie. Le développement d'outils quantitatifs d'analyse cinétique en imagerie moléculaire permet d'obtenir des données plus fiables entre différentes cohortes, différentes études, différents protocoles et différentes espèces. L'utilisation d'outils quantitatifs améliore la précision dans l'analyse des données en recherche. La recherche et le développement en imagerie moléculaire pourraient conduire à l'amélioration des diagnostics et des traitements liés à la maladie.

Avec le vieillissement de la population, les préoccupations liées aux principales causes de décès, dont le cancer et les maladies cardiovasculaires (Hoening et al., 2007), sont incontournables. L'amélioration des traitements oncologique et cardiovasculaire provient souvent d'une meilleure compréhension des mécanismes qui induisent la maladie. Lors de traitements de chimiothérapie, les anthracyclines demeurent encore aujourd'hui la famille d'agents chimiothérapeutiques la plus utilisée, et ce, malgré l'induction de cardiomyopathie (Andrieu-Abadie, 2004).

La toxicité à long terme des traitements oncologiques, généralement négligée, devient de plus en plus préoccupante (Dunnwald et al., 2008; Elbl et al., 2005; Pichon et al., 2005). La détection précoce et les traitements de plus en plus efficaces conduisent à une augmentation significative de la longévité des personnes atteintes d'un cancer, d'où l'importance de réduire et même d'éliminer les effets secondaires à long terme attribués aux traitements de chimiothérapie. L'outil

d'imagerie clinique généralement utilisé aujourd'hui pour l'évaluation de la cardiotoxicité demeure l'évaluation de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (Elbl et al., 2005). Nous pouvons augmenter l'information recueillie dans l'analyse de cardiotoxicité en imagerie avec l'imposant éventail d'outils diagnostiques pour l'analyse cardiaque (Nahrendorf et al., 2009b; Sinusas et al., 2008).

L'objectif de cette thèse de doctorat porte sur la création d'outils nécessaires au suivi avant, pendant et après les traitements de chimiothérapie avec anthracyclines afin d'en optimiser l'efficacité tout en limitant les effets toxiques. Plus particulièrement, avec les traitements associés au cancer du sein, viennent les conséquences toxiques qui lui sont propres, dont le problème de cardiotoxicité. L'un des thèmes porteurs de cette thèse a donc été de mettre au point un modèle d'études précliniques (cancer du sein) permettant d'aider à diagnostiquer cet effet secondaire indésirable et d'évaluer l'efficacité potentielle de cardioprotection de certains médicaments.

Le premier article de la thèse porte sur les analyses cinétiques en milieu clinique et l'utilisation de la fonction d'entrée dérivée de l'image en TEP, ce qui permet d'éliminer le caractère invasif souvent nécessaire des prélèvements artériels multiples. Ces travaux ont été poursuivis en milieu préclinique avec l'utilisation d'un compteur sanguin microvolumétrique pour l'obtention de la fonction d'entrée de façon non invasive chez le rat (résultats non publiés, rapportés à l'Annexe I). Une nouvelle approche de l'utilisation de la fonction d'entrée obtenue avec l'agent de contraste gadolinium-DTPA a été utilisée en IRM pour représenter la fonction d'entrée du ^{18}F -FDG (résultats non publiés, rapportés à l'Annexe II).

Le deuxième article évalue le ^{11}C -acétoacétate, un corps cétonique, en comparaison avec le ^{11}C -acétate, un agent intervenant dans le métabolisme oxydatif. L'analyse cinétique de ces deux radiotraceurs permet d'évaluer la perfusion myocardique ainsi que la consommation en oxygène, principalement reliée à la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Le ^{11}C -acétoacétate permet d'étudier la cinétique des corps cétoniques cardiaques et pourrait potentiellement permettre d'évaluer des mécanismes de cardioprotection.

Finalement, le troisième article établit un examen de la réserve cardiaque chez le rat permettant d'évaluer la cardiotoxicité sous chimiothérapie. Le modèle d'insuffisance cardiaque

induit par un agent de chimiothérapie, la doxorubicine, démontre une diminution de la réserve de perfusion, de consommation en oxygène et de la fraction d'éjection ventriculaire gauche telle que déterminée avec le ^{11}C -acétate.

La mise au point d'outils d'analyse cinétique quantitatifs, l'évaluation de radiotraceurs cardiaques du métabolisme oxydatif et la création d'un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat permettent de mieux comprendre la relation entre la chimiothérapie et la cardiotoxicité. L'intégration de ces notions dans un protocole de suivi simultané chez la souris, de la réponse tumorale au traitement à la doxorubicine et de son impact cardiotoxique fait l'objet d'un nouveau projet, dont l'ébauche est présentée à l'Annexe III.

Chapitre 1. Notions de base

Chapitre 1.1. Les principes de la TEP

L'imagerie par la tomographie d'émission par positrons (TEP) s'effectue à l'aide d'un radioisotope (fluor-18, carbone-11, azote-13 et autres émetteurs de positrons) et d'une caméra munie d'anneaux de détection composés de cristaux, qui captent l'énergie photonique avec une électronique qui archive l'information reçue (Alessio et al., 2004). La détection simultanée de deux photons d'annihilation de 511 keV permet d'identifier des lignes de coïncidence. Le cumul de ces lignes dans le temps permet de produire l'image de l'objet sous étude.

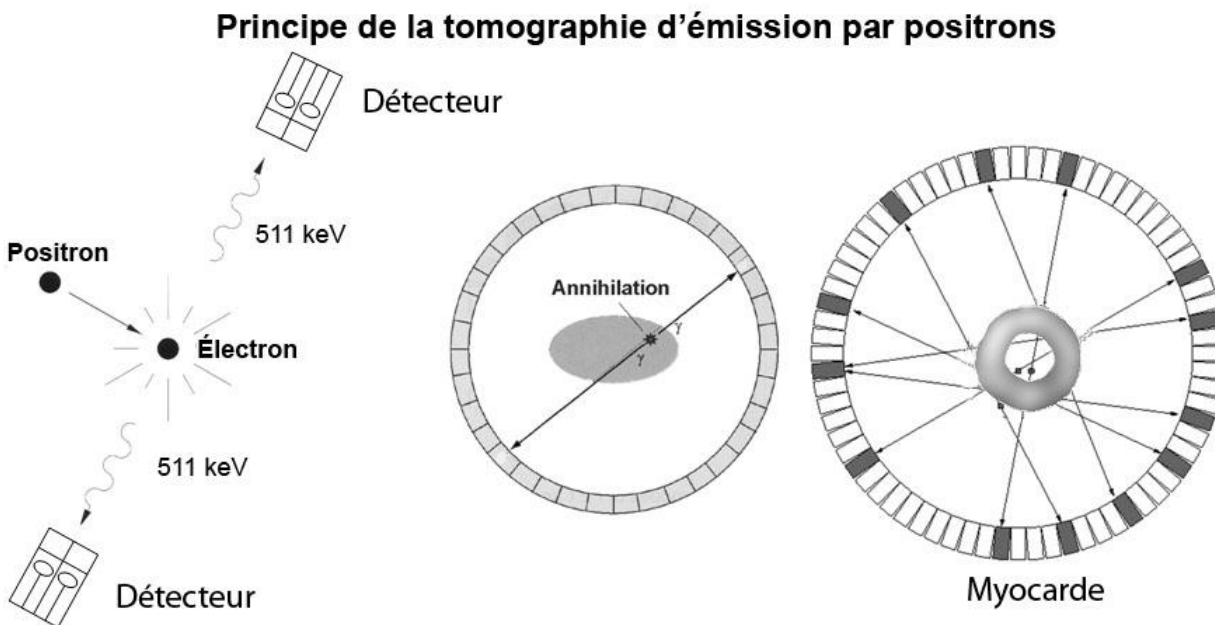


Figure 1.1 – Principe de la tomographie d'émission par positrons

De gauche à droite. Émission de la radioactivité par annihilation de positrons. Détection des photons émis (ligne de coïncidence). Formation de l'image par cumul d'information.

Image modifiée de http://www.uphs.upenn.edu/~pet/pet/pet_ctr_guide.shtml

Généralement, pour produire les images TEP, un radiotracer émetteur de positrons est injecté dans la circulation sanguine pour mettre en évidence une voie biologique à l'intérieur de l'organisme vivant. Le radiotracer émet des positrons qui, après avoir parcouru une courte distance, s'annihilent avec les électrons et émettent deux photons de 511 keV opposés à environ 180 degrés l'un de l'autre. La ligne de coïncidence est détectée et analysée par la caméra TEP (figure 1.1). Plusieurs paramètres intrinsèques et extrinsèques doivent être pris en considération lors de l'acquisition et la reconstruction des images TEP. Entre la désintégration du radiotracer et la formation de l'image de l'objet, il y a notamment le parcours libre moyen du positron, la non-colinéarité des deux photons, l'interférence des coïncidences fortuites et les coïncidences diffusées. L'information recueillie dans les projections, qui est la base de l'image, doit être corrigée adéquatement pour correspondre de façon la plus précise possible à l'objet réel (Cherry et al., 2005). Selon le type d'information recueillie dans l'image, l'algorithme de reconstruction utilisé et les corrections appliquées, la précision quantitative du passage de l'objet à l'image est souvent déficiente. Deux enjeux affectent significativement les données quantitatives de l'image. Tout d'abord, les petits objets ou structures subissent l'effet de volume partiel, qui est une sous-estimation de la concentration radioactive réelle de l'objet. Ensuite, l'effet d'épanchement dû à la contamination d'une source radioactive externe surestime la concentration radioactive réelle de l'objet ou de l'organe étudié (de Dreuille et al., 2002; de Kemp et al., 2010).

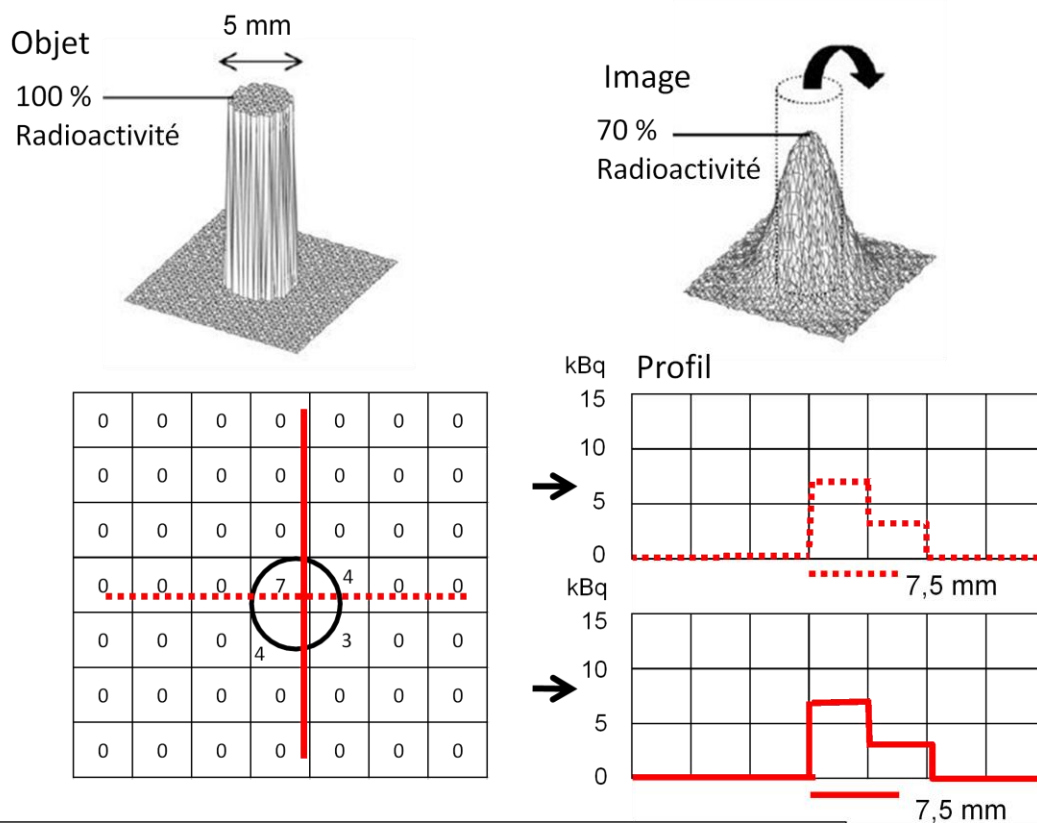
Pour évaluer l'effet de volume partiel, il faut premièrement discuter de l'imagerie quantitative et de résolution spatiale de l'appareil TEP (Prevost et al., 2003; Soret et al., 2007; Surti et al., 2004). L'imagerie quantitative est la corrélation de la radioactivité estimée dans l'image TEP et la quantité réelle de radioactivité de l'objet. Lors d'une acquisition, les photons d'annihilation détectés par la caméra TEP correspondent à une fraction de l'émission radioactive du radiotracer utilisé. La radioactivité est définie par la propriété de désintégration en émettant de l'énergie de façon spontanée et la demi-vie radioactive est associée au temps que prend une quantité radioactive pour diminuer de moitié par un processus de désintégration. Pour la TEP, la radioactivité utilisée résulte en l'émission de photons gammas. Lors d'une acquisition TEP pour un radioisotope donné, l'ensemble des images est corrigé pour la décroissance radioactive et les données brutes de l'image sont représentées par des nombres d'événements dans un espace donné par unité de temps (Coups/sec/voxel). L'événement détecté est transformé en unité

radioactive, le becquerel (Bq) (1 Bq correspond à une désintégration par seconde), par des facteurs de sensibilité propres à la caméra TEP et par le flux d'événements détecté par celle-ci. L'unité de volume du système TEP, le voxel, est généralement convertie en une unité provenant du système métrique, le millilitre (mL). Les unités converties deviennent ainsi des Bq/mL. L'unité (Bq/mL) dans le temps fait la corrélation entre l'activité lue dans un activimètre et celle correspondant à l'intérieur de l'objet dans l'image.

Chapitre 1.1.1. L'effet de volume partiel

L'effet de volume partiel survient lorsque la corrélation entre l'objet et l'image est sous-estimée par rapport à la radioactivité réelle. L'effet se manifeste lorsqu'une structure a une dimension inférieure à la capacité de l'appareil à détecter l'objet adéquatement à cause de sa résolution limitée (figure 1.2).

Effet de volume partiel



Sous-estimation de l'activité présente à l'intérieur de l'objet
Surestimation du diamètre de l'objet

Figure 1.2 – Effet de volume partiel, représentation de l'objet et de l'image en tomographie d'émission par positrons. *Adaptation de « Partial volume effect in PET tumor imaging (Soret et al., 2007) »*

Généralement, l'effet de volume partiel est observé pour des objets de dimensions inférieures à deux fois la résolution spatiale pour des objets cylindriques (Cherry et al., 2003). Pour des objets sphériques, l'effet de volume partiel peut se manifester de trois et même jusqu'à cinq fois la résolution spatiale de l'appareil, selon le radiotracteur et le protocole d'acquisition utilisés. De là l'importance de l'incorporation de ce paramètre pour travailler avec des données quantitatives. Parmi les caractéristiques d'un appareil TEP, la résolution spatiale est l'un des principaux paramètres de performance de la caméra qui correspond à la capacité maximale de l'appareil à

détecter un objet. La résolution spatiale selon les normes manufacturières internationales (NEMA NU-2-2001) est évaluée sur le profil de l'image d'une source ponctuelle à la largeur à mi-hauteur selon les trois dimensions de l'image. La source doit avoir un diamètre de 0,3 mm ou moins pour les appareils précliniques et de 1 mm ou moins pour les appareils cliniques, de façon à ne pas influencer la mesure. On recommande d'utiliser la méthode de rétroprojection filtrée pour reconstruire cette image. Ce procédé permet d'uniformiser les valeurs obtenues pour la comparaison entre les appareils. Cependant, il ne rend pas justice à la résolution spatiale réelle atteinte par certains appareils (Goertzen et al., 2010). Les méthodes itératives sont de plus en plus préconisées et selon le nombre d'itérations utilisées, la valeur de la résolution spatiale peut changer (Dumouchel et al., 2009). Il est donc important de mesurer les performances de l'appareil dans la situation réelle de l'expérimentation prévue et de connaître les caractéristiques qui peuvent influencer les valeurs obtenues à partir de l'image. Ainsi, lorsque pertinent, une correction adéquatement de l'effet du volume partiel sur l'objet de l'image est recommandée.

Chapitre 1.1.2. L'effet de contamination radioactive externe (épanchement)

Un autre aspect important dans la quantification de l'image est la surestimation de la radioactivité dans l'image causée par la contamination résultant du bruit de fond ou de la présence d'une source d'activité intense à proximité (figure 1.3) (Chen et al., 1998; Fang et Muzic, 2008).

Effet de contamination externe (épanchement)

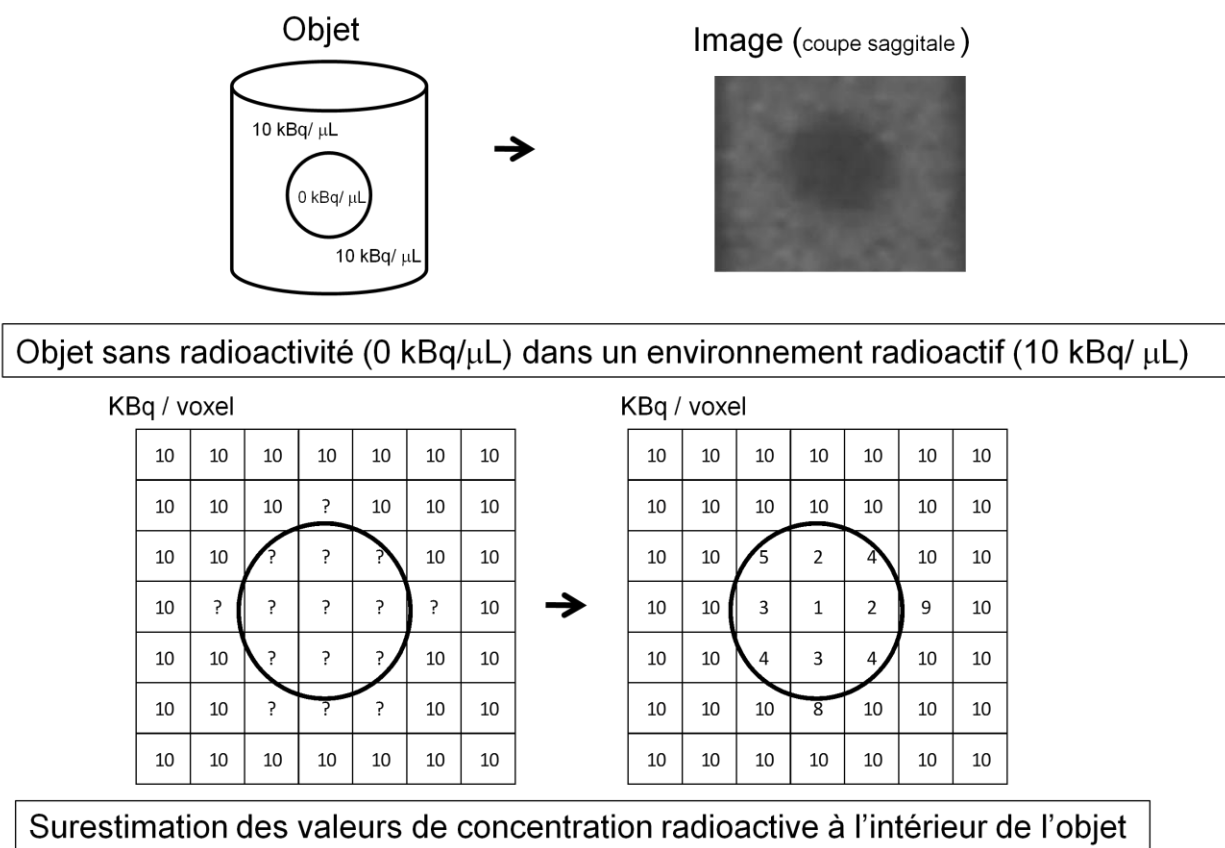


Figure 1.3 – Effet d'épanchement, représentation de l'objet et de l'image en tomographie d'émission par positrons.

Cette situation de contamination radioactive d'épanchement (appelée « spill-in » en anglais) est surtout présente en observant dans le temps la radioactivité dans le système sanguin, ou encore en observant un organe captant faiblement la radioactivité, comme les poumons par exemple. La contamination externe s'évalue par l'acquisition d'une mire, idéalement un cylindre rempli uniformément de radioactivité avec une série d'objets sphériques non radioactifs dont les différents diamètres couvrent la plage d'intérêt de l'effet étudié. La correction pour l'effet d'épanchement sur un organe est généralement appliquée lorsque l'environnement radioactif est supérieur à la radioactivité de celui-ci. Le facteur de recouvrement de la contamination de l'effet d'épanchement (figure 1B de l'article 1) est représenté par une fonction exponentielle inversée en fonction de l'augmentation du diamètre de l'objet.

Donc, pour conclure sur l'imagerie quantitative, il est important de tenir compte des paramètres de l'effet de volume partiel et de la contamination externe (épanchement), afin de représenter le plus fidèlement possible la concentration radioactive de l'objet ou du système étudié. L'imagerie quantitative doit tenir compte de l'effet de volume partiel et de l'effet d'épanchement dans l'analyse cinétique d'imagerie dynamique TEP.

Chapitre 1.2. L'analyse cinétique des images TEP dynamiques

L'analyse cinétique en TEP est l'étude du comportement d'un radiotraceur dans le temps à l'intérieur d'un organisme vivant. La valeur standardisée de captation du radiotraceur (« Standard uptake value (SUV) »), calculée en fonction du poids et de la dose injectée, est la valeur semi-quantitative généralement utilisée (Keyes, 1995). Le « SUV » informe sur le pourcentage de captation à un temps donné par rapport à une quantité initialement injectée (Freedman et al., 2003). L'étude du devenir ou de l'influence du radiotraceur dans l'organisme, est apparu pratiquement en même temps que les caméras TEP avec l'étude cérébrale comme tout premier modèle cinétique compartimental étudié (Sokoloff et al., 1977). Par la suite, des modèles cinétiques pour les autres organes ont été développés, par exemple pour le cœur et les foyers tumoraux (Choi et al., 1991; Eby et al., 2008).

Chapitre 1.2.1. La fonction d'entrée

L'introduction d'un radiotraceur dans un système biologique s'effectue généralement par injection dans le système sanguin. La fonction d'entrée correspond à la concentration sanguine du radiotraceur en fonction du temps (Laforest et al., 2005). Elle permet de modéliser plus précisément la pharmacocinétique de l'organe étudié en imagerie dynamique en fonction de l'entrée et de la sortie du radiotraceur dans le compartiment sanguin. Il existe d'autres moyens pour déterminer la fonction d'entrée comme l'utilisation d'une région de référence ou l'analyse paramétrique (Bentourkia, 2006; Feng et al., 1997; Shidahara et al., 2007). La fonction d'entrée sert de référence (« Gold standard ») dans les publications d'analyse cinétique TEP et est mesurée par des prélèvements artériels dans le temps. Afin de bien caractériser la fonction d'entrée d'un radiotraceur, il faut idéalement connaître la concentration maximale disponible dans le sang, sa fixation aux protéines plasmatiques, ses propriétés physico-chimiques et son affinité pour les tissus. Lors de l'injection du radiotraceur dans le sang, une extraction de premier passage élevé du radiotraceur à l'intérieur de l'organe étudié, permet d'évaluer la perfusion. L'approvisionnement supplémentaire disponible, à la suite de l'extraction du premier passage, pour le tissu ou l'organe d'intérêt permet généralement d'étudier les voies d'accumulation du radiotraceurs. L'utilisation de la fonction d'entrée doit préférablement tenir compte du retour des métabolites radioactifs dans le système sanguin. La fonction d'entrée peut aussi être dérivée de l'image. L'utilisation de l'image pour obtenir la fonction d'entrée se fait généralement lorsque le ventricule gauche est présent, ou des vaisseaux sanguins de gros calibre sur lesquels il est possible de tracer une région d'intérêt. Pour être quantitative, la fonction d'entrée dérivée de l'image doit être corrigée adéquatement pour l'effet du volume partiel et la contamination radioactive externe. Une dimension inférieure à la résolution spatiale de l'appareil peut rendre difficile l'application des corrections, d'où l'importance de choisir judicieusement la région qui servira à calculer la fonction d'entrée. Deux autres techniques d'obtention de la fonction d'entrée seront discutées dans cette thèse au chapitre 5. Il s'agit de l'utilisation d'un compteur microvolumétrique externe connecté à l'artère caudale d'un rat pour obtenir la fonction d'entrée en TEP, ainsi que de l'utilisation de la fonction d'entrée dérivée de l'agent de contraste gadolinium-DTPA utilisé en IRM afin d'obtenir une fonction d'entrée pour le ^{18}F -FDG en TEP.

Chapitre 1.2.2. L'analyse graphique

L'analyse cinétique en TEP s'effectue à partir d'information provenant de l'image. La courbe d'activité dans le temps est obtenue par une région d'intérêt tracée sur une image et elle est transposée sur la série d'images représentant l'acquisition dynamique TEP (Logan et al., 1996; Logan, 2000; Logan et al., 2007; Ogden, 2003; Zhou et al., 2010). La courbe d'activité du tissu dans le temps est nécessaire dans l'analyse graphique. La méthode d'analyse graphique de l'image a été développée initialement pour répondre à une situation très simple où le radiotracer était piégé dans le tissu de façon irréversible. En réalité, il y a très peu de situations où le radiotracer est uniquement piégé par le tissu; il y a toujours un métabolisme ou une voie physiologique qui rend cette hypothèse peu probable. Le radiotracer est considéré irréversible lorsqu'il y a une action comme la phosphorylation du ^{18}F -FDG qui piège majoritairement le radiotracer à l'intérieur de la cellule et qu'il est possible de démontrer une accumulation constante du radiotracer. La méthode d'analyse Patlak en TEP est la méthode graphique la plus largement utilisée. Elle est basée sur deux hypothèses principales (Logan, 2000). 1) Le radiotracer ne doit pas nécessairement être fixé de façon irréversible, mais il doit être intégré dans le tissu de façon constante pendant une période de temps appréciable. 2) La mesure de radioactivité du sang en fonction du temps, elle n'est pas nécessairement évaluée à partir d'échantillons de sang. Elle peut être tirée d'un tissu de référence, à condition que l'accumulation du radiotracer soit négligeable dans le tissu de sorte que les variations d'intensité mesurées correspondent à la perfusion (figure 1.4). L'équation pour calculer le taux d'incorporation, la constante d'entrée K_i , obtenue par la méthode graphique Patlak (Herrero et al., 2004; Kimura et al., 2007; Logan, 2000) est:

$$K_i = \frac{\frac{ROI(t)}{C_p(t)}}{\frac{\int_0^t C_p(t) dt}{C_p(t)}} \quad \text{Équation : méthode d'analyse graphique Patlak (Eq. 1)}$$

où K_i représente la constante de taux de transfert du traceur dans le plasma au compartiment tissulaire d'intérêt, t représente le temps, $ROI(t)$ représente la radioactivité du tissu au temps t ; $C_p(t)$ représente les données de la concentration radioactive plasmatique au temps t .

Analyse graphique de type Patlak

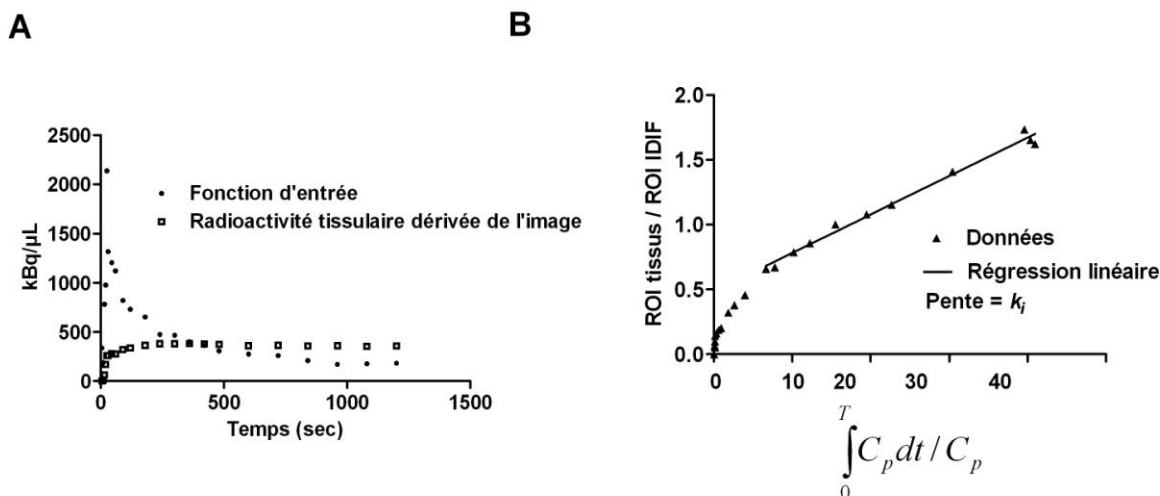


Figure 1.4 - Données brutes (A) et analyse graphique de type Patlak (B). (Adaptation de (Logan, 2000)).

Chapitre 1.2.3 L'analyse compartimentale

Il est possible de synthétiser l'information relative à un processus biologique sous forme de compartiments et de taux d'échanges entre les différents compartiments (DeGrado et al., 2000; Ikoma et al., 2008; Schmidt et Turkheimer, 2002; van den Hoff et al., 1996; van den Hoff et al., 2001; Watabe et al., 2006). Le système sanguin, le milieu extravasculaire ou le cytoplasme d'une cellule, l'action d'une réaction biochimique ou la fixation à un récepteur, correspondent chacun à un compartiment. La cinétique du radiotracer entre les compartiments définit un taux d'échange identifié par des constantes qu'il faut déterminer. Les courbes de radioactivité dans le temps du sang et du tissu sont les deux fonctions analysées pour obtenir les taux d'échange dans l'analyse cinétique. Ces taux d'échange représentent généralement des index qui caractérisent le métabolisme, la fixation à un récepteur ou la perfusion sanguine de l'organe. Il est possible d'intégrer, à l'intérieur des équations, des corrections pour la formation des métabolites qui sont retournés dans le sang, ainsi que de jumeler des sous-étapes dans les voies métaboliques. Le nombre de compartiments dépend du radiotracer utilisé. Ainsi, l'utilisation de l' $^{15}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ ne requiert qu'un compartiment tissulaire et un compartiment sanguin pour mesurer la perfusion

sanguine d'un organe. Nous retrouvons également des modèles plus complexes qui nécessitent de caractériser davantage les processus biologiques comme le ^{18}F -FDG dans le métabolisme du glucose (DeGrado et al., 2000). Le premier compartiment est habituellement le compartiment sanguin. Le premier transfert effectué est le passage du radiotracer présent dans le système sanguin au deuxième compartiment, généralement connu sous le nom de compartiment libre ou tissulaire. Le troisième compartiment est souvent le compartiment d'intérêt. Il représente la liaison au récepteur ou la transformation du radiotracer de façon quasi irréversible (figure 1.5.) (p. ex. la phosphorylation du ^{18}F -FDG). Parfois, un quatrième compartiment représente une liaison non spécifique qui n'est pas la liaison d'évaluation, qui peut être réversible et qui est aussi connectée au compartiment libre ou tissulaire. Il se peut qu'il y ait d'autres compartiments. Par contre, la TEP se limite généralement à l'utilisation de trois compartiments ou moins car l'erreur statistique dans l'utilisation des courbes de radioactivité dans le temps devient trop importante lors de l'utilisation de modèles trop complexes. De même, la robustesse des valeurs obtenues est mise à rude épreuve.

Les taux de transport ou de liaison dans les modèles compartimentaux dérivent d'hypothèses d'un modèle linéaire pour représenter la différence de concentration entre deux compartiments.

Modèle compartimental

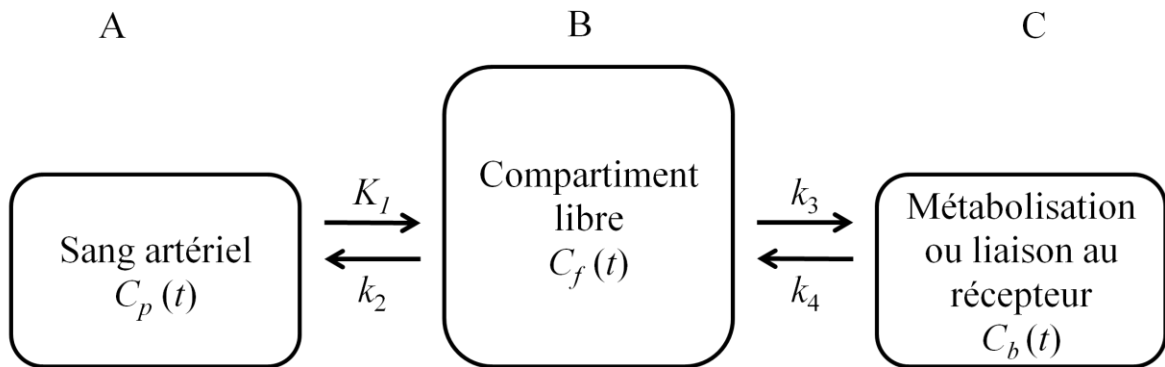


Figure 1.5 – Schématisation de l'analyse compartimentale

Ainsi, La cinétique du traceur est décrite par des équations différentielles de premier ordre:

$$\text{Compartiment A : } \frac{dC_a(t)}{dt} = k_2 C_f(t) - k_1 C_p(t) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Compartiment B : } \frac{dC_b(t)}{dt} = k_1 C_p(t) + k_4 C_c(t) - (k_2 + k_3) C_b(t) \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Compartiment C : } \frac{dC_c(t)}{dt} = k_3 C_f(t) - k_4 C_b(t) \quad (\text{Eq. 4})$$

Cette formulation est permise par une autre hypothèse propre à la propriété d'un traceur, décrit comme étant exempt d'effets pharmacologiques lorsque utilisé dans un système biologique (Watabe et al., 2006). Par contre, dans l'analyse compartimentale, il y a aussi présomption que les compartiments sont homogènes et que le passage d'un compartiment à un autre est fait de façon instantanément homogène. L'activité à un temps précis mesurée par la caméra TEP est la somme de la concentration des compartiments du modèle. Les paramètres de concentration peuvent être déterminés en approximation avec le modèle compartimental par la courbe de radiotraceur dans le système sanguin (« fonction d'entrée ») et la courbe d'activité dans le temps du tissu d'intérêt. L'utilisation des taux entre les compartiments peut être prise de façon singulière pour représenter des index de perfusion (p. ex. K_1 avec $^{13}\text{N-NH}_3$) ou de métabolisme

oxydatif (p. ex. k_2 avec ^{11}C -acétate). Les taux peuvent également être utilisés en combinaison, comme dans la détermination du taux métabolique du glucose (p. ex. ^{18}F -FDG).

$$\text{Taux métabolique du glucose} = \frac{K_1 * k_3}{k_2 + k_3} * \frac{1}{LC} * C_p \quad (\text{Eq. 5})$$

où C_p est la concentration plasmatique du glucose lors de l'acquisition et LC est une constante « lumped constant » regroupant les différences de coefficients entre le radiotracteur ^{18}F FDG et le glucose. Diverses combinaisons des taux d'échange permettent aussi de déterminer le volume de distribution ou la liaison à un récepteur.

Chapitre 1.3. Le métabolisme énergétique du cœur

Pour comprendre les mécanismes du métabolisme cardiaque dans l'insuffisance cardiaque, il faut tout d'abord étudier le métabolisme cardiaque normal (Korvald et al., 2000; Stanley et al., 2005; Yoshinaga et Tamaki, 2007). Le métabolisme énergétique du cœur et sa régulation sont complexes, mais leur compréhension est nécessaire dans l'étude des voies métaboliques, des pathologies cardiaques ou de l'action cardiotoxique lors de traitements pharmacologiques. Les réserves d'ATP disponibles dans les cellules myocardiques s'épuiseraient après quelques battements cardiaques. Pour cette raison, le cœur possède une formidable adaptation dans la transformation des substrats énergétiques disponibles. La production d'ATP dans la mitochondrie dans des conditions normales provient à plus de 95% de la phosphorylation oxydative. De 60 à 70% de l'ATP hydrolysé est dédié à la contraction cardiaque, alors que le reste est utilisé principalement pour le maintien de l'intégrité cellulaire (Stanley et al., 2005).

Le muscle cardiaque est constamment en demande de substrats énergétiques. L'oxydation des acides gras et des hydrates de carbone fournit l'énergie nécessaire aux contractions musculaires cardiaques, par le réticulum sarcoplasmique, et au maintien de l'intégrité cellulaire. Les sources principales sont les acides gras et le glucose, suivis des corps cétoniques, du lactate, du pyruvate ainsi que des acides aminés. Lors des contractions musculaires cardiaques, le maintien de l'approvisionnement en substrats énergétiques est en lien avec la charge de travail. Le cycle ATPasique de l'actomyosine hydrolyse l'ATP en ADP et en phosphate inorganique. L'ATP/ADP translocase permet l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie et le retour de l'ATP

dans le cytosol. L'ADP mitochondriale sera utilisée par l'ATP synthase pour produire de nouveau de l'énergie. La vitesse de consommation en oxygène et l'oxydation des acides gras augmentent de façon proportionnelle avec l'augmentation du travail cardiaque.

Dans la mitochondrie, la phosphorylation oxydative est modulée par le substrat énergétique qui provient principalement de la bêta-oxydation des acides gras et du pyruvate de la glycolyse en moins grande importance. La régulation du métabolisme myocardique est reliée à la concentration artérielle des hydrates de carbone, le statut inotrope, la concentration hormonale, la perfusion coronarienne et la concentration sanguine des substrats énergétiques disponibles (Stanley et al., 2005). À capacité maximale de travail cardiaque, la machinerie métabolique utilise le transfert d'électrons et la consommation d'oxygène par la phosphorylation oxydative de 80 à 90%. En période de repos, cette machinerie représente seulement de 15 à 25% de ce maximum utilisé (Stanley et al., 2005). Lors d'une cardiomyopathie, cet écart d'utilisation de consommation en oxygène entre le repos et l'effort donne une plage d'adaptation assez importante afin de conserver un équilibre. L'augmentation de travail cardiaque jumelée à une réduction d'efficacité ne modifie pas la concentration d'ATP à l'état de repos, d'où l'importance d'évaluer la réserve myocardique représentée par le ratio entre l'état de repos et d'effort maximal.

Chapitre 1.3.1. Le métabolisme des hydrates de carbone

De 10 à 40% de l'énergie consommée par le cœur provient de l'oxydation du pyruvate qui est partagée de façon équivalente entre la glycolyse et l'oxydation du lactate. La glycolyse convertit le glucose-6-phosphate avec un NAD⁺ en pyruvate et NADH et génère deux molécules d'ATP pour chaque molécule de glucose. Le pyruvate et le NADH entrent dans la mitochondrie afin de produire de nouveau du NAD⁺ et du CO₂, et compléter ainsi le processus aérobique de la glycolyse oxydative ou de la conversion en lactate (Stanley et al., 2005; Yoshinaga et Tamaki, 2007). Lors d'ischémie, la conversion en lactate dans la mitochondrie est favorisée. L'insuline active la voie glycolytique qui a comme substrat le glucose exogène et le glycogène emmagasiné. La translocation de GLUT-4 qui augmente le transport du glucose exogène est stimulée par l'AMP-activé par protéine kinase (AMPK) qui elle, est amplifiée lors d'une augmentation du travail cardiaque. Les enzymes hexokinase, glucokinase, pyruvate kinase ainsi

que la phosphofructokinase-1 (PKF-1) participent à des étapes catalytiques irréversibles. La PFK-1, la première étape catalytique spécifique à la glycolyse, est inhibée par son produit et une chute de pH. De plus, une augmentation de citrate est inhibitrice de la PFK-1 qui est la régulation clé entre la glycolyse et le métabolisme oxydatif mitochondrial.

Régulation de l'oxydation du glucose

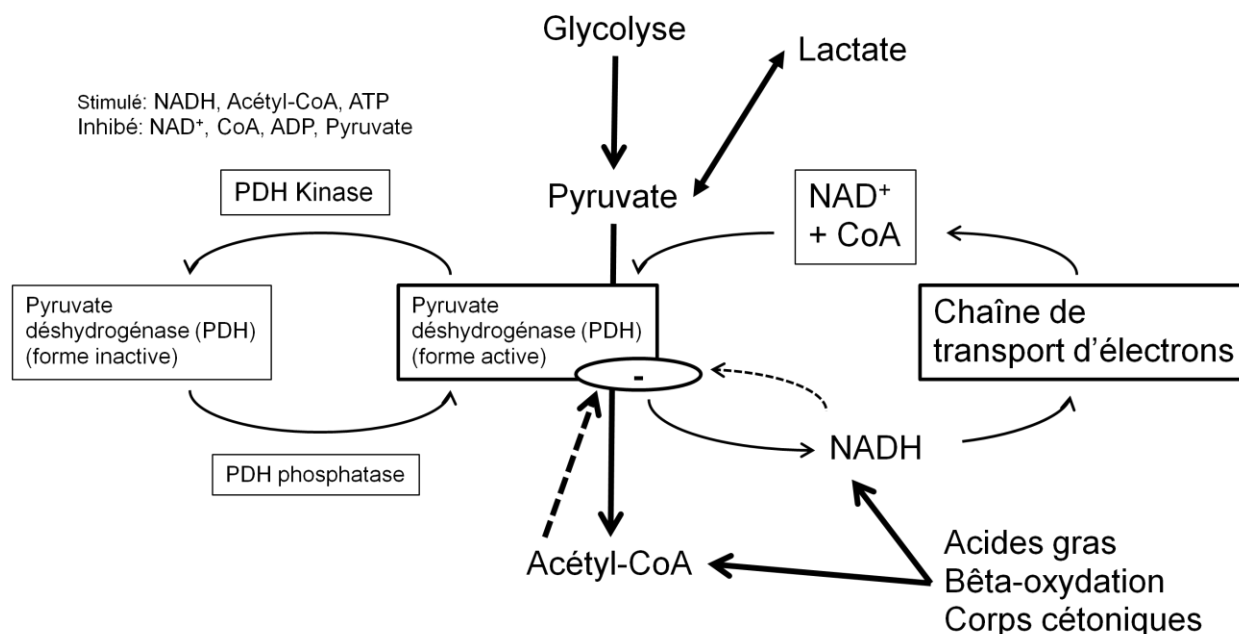


Figure 1.6 – Voie de la régulation de l'oxydation du glucose par les cellules myocardiques. *Adaptation de « Myocardial Substrat Metabolism in the Normal and Failing Heart (Stanley et al., 2005)»*

Plusieurs facteurs influencent l'activité glycolytique: l'insuline, le glucagon, l'épinéphrine, la norépinéphrine ainsi que les hormones thyroïdiennes. Le pyruvate provenant de la glycolyse va produire du lactate ou de l'acétyl-CoA. La pyruvate déshydrogénase (PDH) est l'enzyme de conversion vers l'acétyl-CoA. Le pyruvate est modulé par la PDH kinase sensible principalement à la concentration élevée d'acétyl-CoA, d'ATP, de facteurs CoA et de pyruvate. Elle est aussi indirectement régulée par les corps cétoniques et la bêta-oxydation des acides gras via la concentration de NADH (figure 1.6).

Chapitre 1.3.2. Le métabolisme des acides gras

La vitesse d'entrée des acides gras libres (AGL) dans le myocarde est principalement reliée à la concentration des AGL plasmatiques. Ils entrent par diffusion passive ou par les protéines de transport facilité. Les AGL non-estérifiés entrent dans le cytosol avec une protéine de liaison des acides gras (FABP) et forment des acyl-CoA par l'enzyme acyl-CoA synthétase des acides gras (FACS). Les longues chaînes d'acyl-CoA peuvent être estérifiées en triglycéride ou converties en acyl-carnitine afin d'entrer dans la mitochondrie comme substrats énergétiques du cycle de Krebs (figure 1.7) (Lopaschuk et al., 2010; Tuunanen et al., 2008; Yoshinaga et Tamaki, 2007). Dans des conditions normales, 70 à 90% des AGL entrés dans le cœur seront métabolisés en CO₂ et H₂O. La bêta-oxydation mitochondriale consomme principalement les AGL et, à un degré moindre, les péroxysomes. La bêta-oxydation des AGL produit principalement du NADH, du FADH₂ et de l'acétyl-CoA pour le cycle de Krebs. Principalement, les activateurs du cycle de Krebs sont la présence de NAD et de la coenzyme A (CoASH), impliquées dans la production du substrat de départ. Dans le cas contraire, lors d'un surplus de substrat, l'acétyl-CoA, retourne dans le cytoplasme et est convertie en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Cette acétyl-CoA est impliquée dans l'élongation des chaînes d'acides gras, dans l'inhibition de la carnitine palmitoyltransférase I (CPT I), et aussi lors du transfert du groupement acyl dans la mitochondrie pour la bêta-oxydation; ce qui conduit à une diminution d'activité du cycle de Krebs et à une augmentation de la lipogénèse. Le point important de régulation semble être la production de malonyl-CoA par l'ACC à partir de l'acétyl-CoA. Le malonyl-CoA est l'inhibiteur physiologique de CPT I et donc, de la bêta-oxydation. De ce fait, il y a alors réciprocity entre bêta-oxydation et lipogénèse (figure 1.7).

Le métabolisme oxydatif, principale voie de production d'énergie, fonctionne majoritairement avec le glucose converti en pyruvate et l'acyl-CoA des acides gras, qui tous deux deviennent de l'acétyl-CoA afin d'entrer dans le cycle de Krebs pour former ultimement des produits réducteurs qui activent la phosphorylation oxydative et mènent à la production de l'ATP. La bêta-oxydation mitochondriale repose sur le transit des acides gras sous forme d'acyl-CoA dans le cytosol du myocyte vers la mitochondrie. Grâce à l'intervention de l'acyl-CoA synthétase, la carnitine palmitoyl transférase I et II (CPT I et II) et d'une translocase, l'acyl-CoA entre dans la

mitochondrie par l'hélice de Lyman et devient de l'acétyl-CoA intramitochondriale au sein de la mitochondrie.

Métabolisme des acides gras

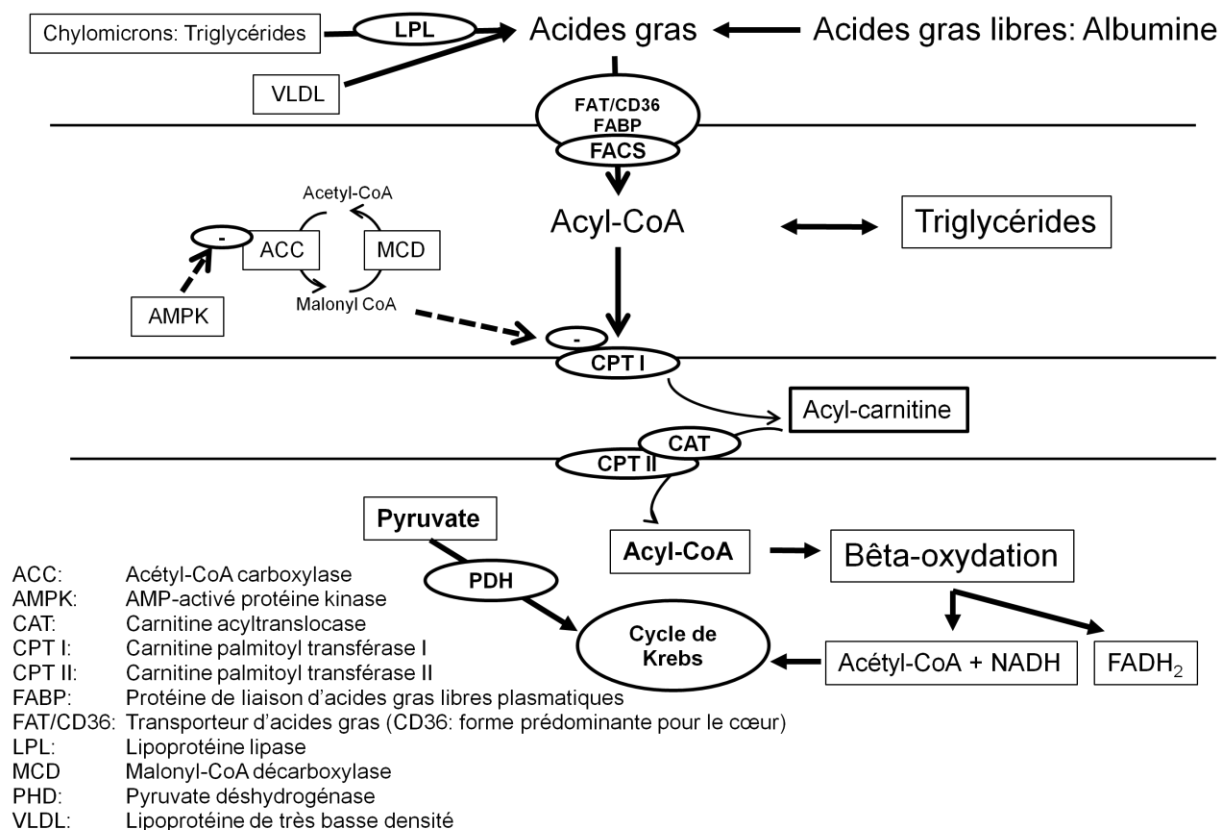


Figure 1.7 – Voie du métabolisme des acides gras par les cellules myocardiques. *Adaptation de « Myocardial Substrat Metabolism in the Normal and Failing Heart » (Stanley et al., 2005).*

Chapitre 1.3.3. L'acétate et l'acétoacétate, des corps cétoniques

Le cœur oxyde les corps cétoniques en fonction de leur disponibilité qui est représentée par la concentration sanguine. Les niveaux de corps cétoniques sanguins chez l'humain sont relativement bas aux conditions normales. Par contre, lors d'un exercice physique, d'un jeûne, de la fièvre ou d'une infection, le glucose devient une ressource limitée. Ce sont les acides gras et

les corps cétoniques, l'acétoacétate et le 3-hydroxybutyrate, surtout via la cétogenèse hépatique, qui deviennent les substrats énergétiques principaux du cœur (Lopaschuk et al., 2010; Yoshinaga et Tamaki, 2007). La présence de corps cétoniques inhibe l'oxydation des acides gras, transforme le pyruvate déshydrogénase sous sa forme inactive et active les produits d'inhibition, le NAD⁺, la coenzyme A (CoA) et l'ADP qui inhibent l'oxydation du glucose. Les corps cétoniques et l'acétate seront favorisés comme substrats énergétiques lorsqu'ils sont présents. L'acétate et l'acétoacétate entrent dans la cellule myocardique par le même transporteur d'acides monocarboxyliques. Une fois dans le cytosol, l'acétoacétate peut être transformé en acétoacétyl-CoA par l'acétoacétyl-CoA synthétase ou entrer dans la mitochondrie pour agir avec la « succinyl-CoA: 3-oxoacide CoA transférase » pour être converti en acétoacétyl-CoA. Dans le cytosol, l'acétoacétyl-CoA peut être interconverti en acétyl-CoA par l'acétoacétyl-CoA thiolase et même devenir un acide gras ou un stérol. Dans la mitochondrie, l'acétoacétyl-CoA est transformé par l'acétoacétyl-CoA thiolase en acétyl-CoA. Pour ce qui est de l'acétate, un substrat énergétique quasi exclusif, il doit entrer dans la mitochondrie pour être converti en acétyl-CoA par l'acétyl-CoA synthétase. Le pyruvate, les acyl-CoA, l'acétate et l'acétoacétate sont tous transformés en acétyl-CoA dans la mitochondrie. Ces substrats énergétiques alimentent le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP, principalement pour les contractions cardiaques qui sont étroitement reliées au travail cardiaque (Morris, 2005; Wallace et al., 2010; Wallace, 2003).

Chapitre 1.4. L'insuffisance cardiaque

La cardiomyopathie est une atteinte du muscle cardiaque. Elle existe sous quatre formes : dilatée (la plus courante), hypertrophique, restrictive et arythmogène du ventricule droit. L'insuffisance cardiaque est le résultat de la complication d'une cardiomyopathie ou d'une cardiopathie ischémique. Elle se définit comme étant un syndrome clinique complexe qui provient d'un défaut structurel ou fonctionnel, affectant la capacité du ventricule à se remplir ou rejeter le sang. Lorsqu'il est incapable d'assumer sa fonction de pompe sanguine et d'assurer un débit cardiaque qui répond au besoin énergétique de l'organisme, le cœur va généralement s'adapter par une dilatation ventriculaire gauche ainsi qu'une accélération du rythme cardiaque. Environ deux tiers des cas d'insuffisance cardiaque sont liés à une histoire d'ischémie cardiaque.

Le volume systolique, le facteur principal de l'insuffisance cardiaque, représente la différence entre les volumes télédiastolique et télésystolique. Le volume télédiastolique est le volume sanguin maximal dans le ventricule, juste avant la contraction ventriculaire. Il est déterminé par la durée de la période de remplissage, la diastole, et par la pression exercée par le système veineux. Le volume télésystolique est le volume résiduel dans le ventricule, après la contraction ventriculaire. Il est déterminé par la force de contraction ainsi que par la pression artérielle. Trois principaux facteurs influencent le volume systolique. Le premier facteur est la précharge. Elle représente le degré d'étirement des cellules myocardiques avant la contraction (volume télédiastolique) et est surtout influencée par le retour veineux. La diminution de la fréquence cardiaque augmente le temps de remplissage, la diastole. Le deuxième facteur est la contractilité. Elle est synergique au degré d'étirement des fibres musculaires du ventricule ainsi qu'au volume télédiastolique. Elle tente d'abaisser le volume télésystolique. Le troisième facteur est la postcharge. Elle représente la pression s'opposant à la sortie du sang lorsqu'il y a contraction des ventricules. L'hypertension artérielle (postcharge) réduit la capacité du volume systolique.

L'insuffisance cardiaque provient généralement d'une diminution de la capacité de contraction du myocarde, d'une surcharge de pression (postcharge), ou d'une surcharge de volume (précharge). Les mécanismes d'adaptation sont, dans un premier temps, la stimulation neuro-hormonale, par exemple, lorsque le système sympathique libère la noradrénaline, un agent chronotrope positif qui intensifie la force de contraction et le rythme cardiaque ou l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone pour adapter la pression sanguine. La loi du cœur de Frank Starling est basée sur l'augmentation de la force de contraction du myocarde en relation avec le degré d'étirement des cellules musculaires cardiaques en télédiastole. L'accroissement des pressions intra-ventriculaires crée une augmentation du volume télédiastolique et contribue à maintenir ou à augmenter le volume systolique, permettant ainsi au cœur de se dilater progressivement. Dans l'évolution de la maladie, il se produira un remodelage ventriculaire gauche pour maintenir un volume systolique suffisant et ce, malgré une demande augmentée de consommation en oxygène par le cœur ainsi qu'une réduction de la capacité de distension des ventricules. La progression de la maladie amène une tolérance de l'activation du système sympathique associée à une diminution de la synthèse et d'activation des récepteurs bêta-1 adrénergiques cardiaques. De plus, la loi de Frank Starling a ses limites. Dépassé un certain

seuil d'élongation, les fibres cardiaques n'ont plus la relation de contractilité efficace en lien avec l'élongation de celles-ci. L'insuffisance cardiaque, comparativement à un cœur en santé, démontre une courbe diminué de débit cardiaque en fonction des pressions de remplissage, car la pression télédiastolique du ventricule gauche continue d'augmenter alors que le volume systolique reste semblable ou n'augmente que très peu (Jan, 2005).

La cardiomyopathie peut être attribuée à de nombreux facteurs: un problème coronarien ou congénital, une hypertension chronique, une infection, un abus de drogue ou d'alcool, des traitements de chimiothérapie, le diabète, ou tout simplement un facteur idiopathique. Les traitements de la cardiomyopathie visent à réduire la pression artérielle, à réduire ou à augmenter le rythme cardiaque, à dilater les vaisseaux sanguins, ou à éclaircir le sang. La cardiomyopathie dilatée, le cas le plus fréquent, et la résultante ischémique sont généralement traitées séparément. Plusieurs pathologies cardiaques sont diagnostiquées en imagerie médicale (Nahrendorf et al., 2009b). La médecine nucléaire (TEM et TEP), l'échographie, l'électrocardiographie, la TDM, le Holter cardiaque (utilisé pour suivre le rythme cardiaque pendant 24 à 48 heures), l'angiographie et l'épreuve d'effort (qui évalue la réponse cardiaque lors d'une demande énergétique importante) sont tous des examens utilisés pour diagnostiquer la présence de cardiomyopathie. Dans l'évaluation de l'épreuve d'effort, on constate la tolérance générale du sujet à l'effort, la tension artérielle, ainsi que l'activité électrocardiographique. L'épreuve d'effort aide généralement au diagnostic d'une maladie coronarienne. (Agostini et al., 2008; Hatem, 2007; Juilliere et Delahaye, 2009; Libersa et al., 2004).

Chapitre 1.4.1. La cardiomyopathie induite par la doxorubicine, une anthracycline

Dans la famille des anthracyclines, nous retrouvons la daunorubicine et la doxorubicine, qui sont isolées des bactéries (*Streptomyces peucetius*), et les molécules synthétiques épiburidine, idarubicine et l'ésorubicine, pour ne nommer que celles-ci. Les anthracyclines sont surtout utilisées pour les traitements en oncologie s'adressant à des patients atteints d'un lymphome, d'une leucémie ou ayant une tumeur solide, comme le cancer du sein. Par contre, les effets indésirables sur l'hématopoïèse et la fonction cardiaque en limitent la dose car elle est

cumulative (Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004). Il est possible de pallier au problème d'hématopoïèse transitoire lors des traitements de façon relativement efficace, ce qui n'est pas le cas pour la cardiotoxicité. La cardiotoxicité des anthracyclines est observée sous forme aiguë, subaiguë, chronique ou tardive. Les cliniciens ont limité la dose cumulative afin de réduire l'incidence d'insuffisance cardiaque observée sous le seuil des 0,5%. L'utilisation des anthracyclines est limitée car il est possible d'observer l'apparition d'une insuffisance cardiaque, même lors du premier traitement, et les traitements sont contre-indiqués pour tout patient présentant déjà un problème cardiaque. La compréhension de l'induction de la cardiomyopathie par les anthracyclines suscite encore aujourd'hui plusieurs débats. La cardiomyopathie dilatée et l'insuffisance cardiaque se développent généralement dans l'année qui suit les traitements aux anthracyclines. Les caractéristiques morphologiques sont une perte de myofibrilles, la dilatation des réticulums sarcoplasmiques, une augmentation de lysosomes et une vacuolisation cytoplasmique des mitochondries. Les espoirs de développer une stratégie pour contrer les effets cardiotoxiques des anthracyclines sans altérer l'action sur les foyers tumoraux, découlent du fait que l'action antitumorale est différente de celle de la cardiotoxicité. L'action principale de la doxorubicine sur les cellules tumorales est l'interaction avec la topoisomérase II et l'ADN en inhibant l'action mitotique et en conduisant les cellules vers un processus apoptotique.

L'attaque cardiotoxique est différente, principalement parce que le taux de division cellulaire au niveau des cellules myocardiques est faible. De plus, les protecteurs comme la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase, impliqués dans la décomposition et la transformation des radicaux et des superoxydes, sont peu présents (Mukhopadhyay et al., 2009). Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), l'implication du fer ainsi que l'induction de l'apoptose sont les principaux intervenants dans les mécanismes de cardiotoxicité. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le doxorubicinol sont tous dérivés de la présence de doxorubicine dans la cellule myocardique et vont permettre le relâchement du fer présent dans les enzymes aconitases. L'aconitase est l'enzyme de conversion du citrate en isocitrate dans le cycle de Krebs. Lorsqu'elle perd ses groupements de fer et de soufre, il y a conversion de l'aconitase en une protéine régulatrice de fer (IRP-I). Celle-ci inhibe le récepteur de transferrine (TfR) et augmente la concentration de fer libre dans la cellule. La réaction du fer avec $O_2^{\cdot-}$ et le

H_2O_2 amplifie les réactions de radicaux libres et conduit la cellule myocardique dans la voie apoptotique (figure 1.8) (Minotti et al., 2004).

Cardiotoxicité de la doxorubicine

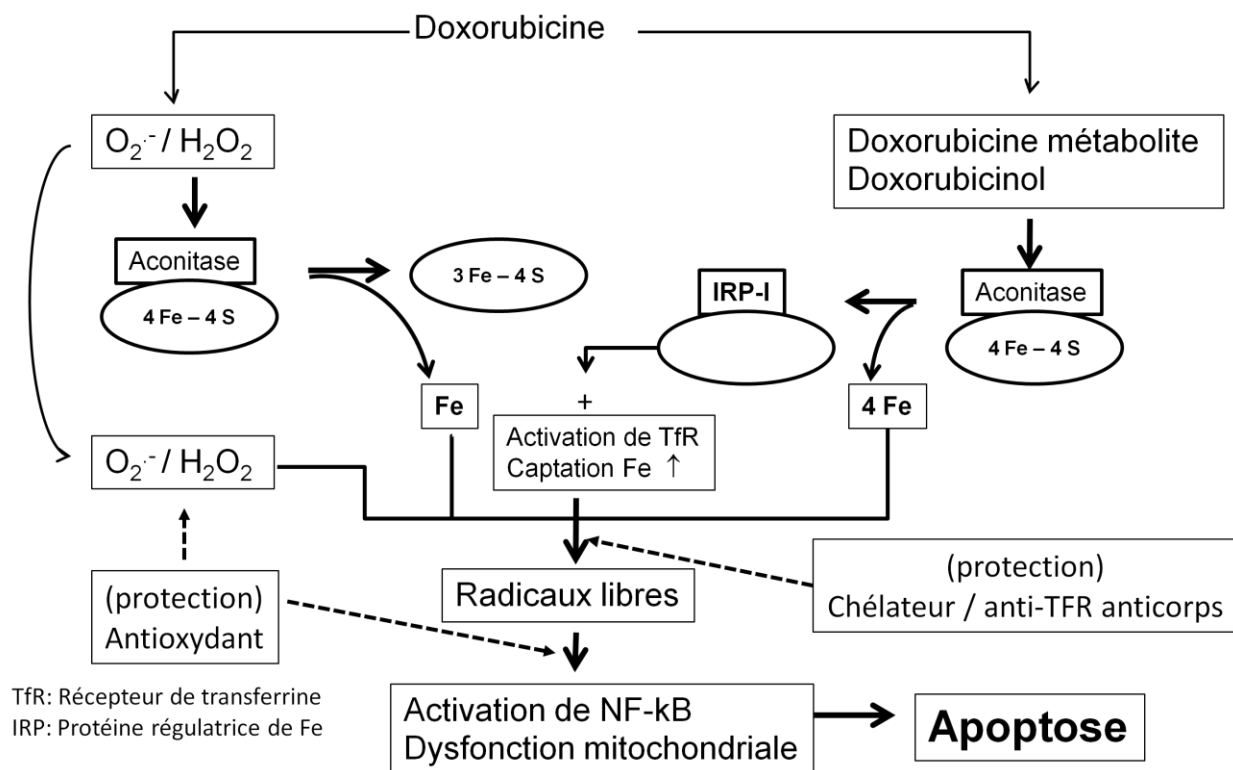


Figure 1.8 – Voie d'action de la doxorubicine sur les cellules myocardiques.

Schéma adapté de « Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity » (Minotti et al., 2004), Fig. 10.

Les dommages mitochondriaux sont observables par la relâche de cytochrome C dans le cytosol et une diminution de la production d'ATP. Un problème mitochondrial affecte directement le métabolisme oxydatif, qui est prédominant dans la cellule myocardique.

Chapitre 1.5. Problématiques et hypothèses de recherche

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez les femmes à travers le monde. Les principaux traitements pour remédier à cette maladie sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Pour les traitements de chimiothérapie avec la doxorubicine, le principal effet secondaire est la cardiotoxicité et ceci en limite son utilisation. Plusieurs recherches sur le sujet ont été dirigées pour diminuer et même éliminer cet effet secondaire. La doxorubicine agit différemment sur les foyers tumoraux comparativement à sa toxicité sur le cœur. Cette situation fait de la doxorubicine un modèle d'étude très intéressant et l'utilisation d'un cardioprotecteur efficace pourrait en augmenter son utilisation dans les traitements de chimiothérapie. À ce jour, seule l'évaluation de la fraction d'éjection ventriculaire gauche demeure l'outil généralement utilisé pour l'évaluation de la cardiotoxicité.

Dans cette optique, l'imagerie dynamique TEP permet l'exploration *in vivo* de l'être vivant et est en concomitance aux recherches classiques sur la physiologie, la biologie moléculaire et la recherche *ex vivo*. Elle a le potentiel d'augmenter nos connaissances fondamentales tout en permettant une intégration globale de la complexité biologique dans son ensemble.

La ligne directrice de cette thèse consiste en l'obtention d'outils en imagerie dynamique TEP pour étudier les voies biologiques du cancer du sein et des traitements de chimiothérapie à la doxorubicine qui induit une cardiotoxicité. La création de nouvelles méthodes et de modèles en imagerie peut nous aider à comprendre la corrélation entre des dommages mitochondriaux cardiaques et une diminution de la fraction d'éjection. La mise au point d'analyses cinétiques, l'évaluation de radiotraceurs cardiaques pour étudier le métabolisme oxydatif et la création d'un modèle d'insuffisance cardiaque contribuent à notre compréhension de la relation entre la doxorubicine et l'insuffisance cardiaque. Sommes-nous en mesure d'évaluer adéquatement de façon quantitative, en imagerie TEP dynamique, les changements lors d'une atteinte métabolique ou physiologique?

L'imagerie dynamique TEP nécessite souvent l'utilisation d'une fonction d'entrée afin d'effectuer des analyses cinétiques. Le premier sujet de cette thèse, en clinique, a été l'utilisation de la fonction d'entrée dérivée de l'image dans l'analyse des index de perfusion et de

consommation. Des mires qui représentent des vaisseaux sanguins ainsi que l'injection d'un radiotracer à l'intérieur d'un système biologique ont permis l'évaluation des phénomènes de volume partiel et d'épanchement. Le premier article analyse différents radiotraceurs et organes cibles avec la fonction d'entrée dérivée de l'image. L'utilisation de cette fonction d'entrée permet d'éliminer le caractère invasif souvent nécessaire des prélèvements artériels. L'implantation de cette méthode moins invasive que les prélèvements sanguins séquentiels dans le temps pourrait faciliter le recrutement des patients et simplifier les protocoles d'étude lors de recherches cliniques.

Dans l'imagerie dynamique TEP cardiaque, un radiotracer qui caractérise la consommation en oxygène pourrait refléter adéquatement les principaux mécanismes qui se déroulent dans les mitochondries. L'hypothèse généralement retenue sur l'action cardiotoxique de la doxorubicine aux cellules cardiaques serait une création de dommage mitochondrial. Le deuxième sujet de cette thèse est le ^{11}C -acétoacétate, un corps cétonique et le ^{11}C -acétate, des radiotraceurs qui peuvent refléter des indices de perfusion myocardique et de la consommation en oxygène chez le petit animal. Le ^{11}C -acétoacétate a le potentiel d'étudier les corps cétoniques cardiaques qui, selon la littérature, auraient un potentiel d'implication dans les mécanismes de cardioprotection.

Toujours en imagerie dynamique TEP, un examen de la réserve cardiaque permet d'évaluer différents états physiologiques du cœur ainsi que ses artères coronaires. L'établissement d'un modèle animal qui caractérise la cardiotoxicité induite par la doxorubicine est le troisième sujet de cette thèse. Un examen de la réserve cardiaque chez le rat précise l'information diagnostique de cardiotoxicité comparativement à l'examen seul de l'évaluation de la fraction d'éjection ventriculaire gauche. Une diminution de la réserve de perfusion et de consommation en oxygène corrélée à une diminution de la fraction d'éjection augmente les notions de compréhension sur l'insuffisance cardiaque par induction chimique.

Finalement, dans les travaux non publiés de cette thèse, deux projets sur la fonction d'entrée du ^{18}F -FDG chez le rat et une étude pilote de l'évaluation simultanée de la réponse aux traitements de doxorubicine et de sa cardiotoxicité ont été explorés. Le premier projet a été sur les prélèvements sanguins artériels par l'artère caudale avec l'utilisation d'un compteur microvolumétrique couplé à une pompe péristaltique. Cette technique permet d'obtenir la

fonction d'entrée du ^{18}F -FDG sans nécessiter un recours à la chirurgie. Elle donne accès à l'analyse des métabolites sanguins ainsi qu'à l'évaluation de marqueurs biologiques. De plus, l'utilisation d'un compteur microvolumétrique pourrait diminuer les volumes de sang prélevé sur l'animal et ainsi permettre des recherches longitudinales. Le deuxième projet sur la fonction d'entrée du ^{18}F -FDG est l'obtention de celle-ci à partir de l'agent de contraste en IRM, le gadolinium-DTPA. Cette nouvelle méthode pourrait contribuer à l'utilisation dynamique bimodale et participer aux développements de nouveaux types d'analyse cinétique. Finalement, le dernier projet est l'étude chez la souris chez qui nous avons inoculé préalablement des foyers tumoraux de cancer du sein. Le projet consiste à bâtir un protocole de suivi simultané de la réponse aux traitements à la doxorubicine, et de son impact cardiotoxique. Ceci fait office de base pour les études subséquentes d'évaluation de nouveaux cardioprotecteurs.

Chapitre 2 Article (1)

Image-derived input function in dynamic human PET/CT: methodology and validation with ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ^{18}F -fluorodeoxyglucose in brain.

Etienne Croteau, Eric Lavallée, Sébastien L Ménard, Laurent Hubert, Fabien Pifferi, Jacques A Rousseau, Stephen C Cunnane, André Carpentier, Roger Lecomte et François Bénard.

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 37(8):1539-50 2010

Ma contribution a été majeure (>85%) dans l'élaboration, la conception, l'expérimentation, l'analyse et la rédaction.

Chapitre 2.1. Résumé de l'article en français

Objectif: Malgré l'avancement des systèmes TEP / TDM, la prise de sang artérielle demeure la méthode de référence pour obtenir la fonction d'entrée d'un radiotracer pour l'analyse pharmacocinétique en imagerie TEP. Le but de cette étude est de valider l'utilisation de la fonction d'entrée dérivée de l'image (IDIF) des artères carotidiennes ou fémorales pour obtenir la fonction d'entrée artérielle (AIF). Les données analysées ont été obtenues à partir de deux études cliniques différentes, l'une utilisant le ^{11}C -acétate et l'acide ^{18}F -fluoro-6-thia-heptadécanoïque (^{18}F -FTHA) dans l'analyse métabolique des muscles fémoraux et l'autre utilisant le ^{18}F -FDG pour l'imagerie du cerveau.

Méthodes: La méthode de quantification a été validée avec deux systèmes de mires. Premièrement, une mire statique comprenant des seringues de diamètres différents, contenant de la radioactivité ou non, a été utilisée pour déterminer le facteur de recouvrement de l'effet de volume partiel (FRVP) et un facteur pour la radioactivité externe qui contamine la lumière du vaisseau sanguin étudié, ou effet d'épanchement. Deuxièmement, une mire dynamique simulant l'injection intraveineuse du radiotracer dans le système sanguin a été utilisée pour établir la corrélation entre les prélèvements de sang de l'AIF et celle de l'IDIF. Ensuite, selon les diamètres des vaisseaux étudiés, les corrections de FRVP et d'épanchement ont été appliquées aux données cliniques, soit aux artères fémorales de l'imagerie TEP avec les données obtenues du ^{11}C -acétate et du ^{18}F -FTHA, et aux artères carotidiennes de l'imagerie cérébrale au ^{18}F -FDG. Une corrélation a été effectuée entre les données IDIF et les prélèvements sanguins des patients lors des études cliniques.

Résultats: Avec le ^{11}C -acétate, l'indice de perfusion dans le muscle fémoral est de $0,34 \pm 0,18 \text{ min}^{-1}$, lorsqu'il est estimé à partir des prélèvements sanguins, $0,29 \pm 0,15 \text{ min}^{-1}$, lorsqu'il est estimé à partir de l'IDIF corrigée, et de $0,66 \pm 0,41 \text{ min}^{-1}$, lorsque les données d'IDIF n'étaient pas corrigées par le FRVP. Une analyse de type ANOVA et Tukey a démontré une différence statistiquement significative de l'IDIF non corrigée par le FRVP ($p < 0,0001$). Pour l'analyse d'incorporation musculaire des fémurs du ^{18}F -FTHA, nous observons une forte corrélation entre les taux obtenus à partir de l'IDIF corrigée pour le FRVP et l'épanchement dans l'analyse graphique de type Patlak et les taux obtenus directement par les prélèvements (vastus lateralis $r =$

0,86, $p = 0,027$; biceps fémoral $r = 0,90$, $p = 0,017$). D'autre part, il n'y a pas de correspondance entre les valeurs obtenues à l'aide de l'AIF et l'IDIF non corrigée. Finalement, pour l'étude du taux métabolique cérébral (CMRglc) au ^{18}F -FDG, l'IDIF de l'artère carotidienne corrigée pour le FRVP estime adéquatement les taux métaboliques avec $14,0 \pm 5,7$ mg/100 g/min comparativement à $13,1 \pm 3,9$ mg/100 g/min obtenue par les prélèvements sanguins ($r^2 = 0,90$). L'utilisation simple de l'IDIF non corrigée surestime les valeurs de CMRglc.

Conclusion: Corrigée adéquatement, l'IDIF de l'artère carotidienne ou fémorale peut être utilisée comme substitut aux prélèvements sanguins pour l'analyse cinétique en imagerie dynamique TEP, pour l'étude des muscles de la cuisse et les études cérébrales.

Chapitre 2.2. Texte de l'article

Image-derived input function in dynamic human PET/CT: methodology and validation with ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ^{18}F -fluorodeoxyglucose in brain

Etienne Croteau¹, Éric Lavallée¹, Sébastien L. Ménard³, Laurent Hubert¹, Fabien Pifferi^{2,4}, Jacques A. Rousseau¹, Stephen C. Cunnane^{2,3}, André C. Carpentier³, Roger Lecomte¹ and François Bénard⁵

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada and Sherbrooke Molecular Imaging Center, Centre de recherche clinique Étienne-LeBel, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

²Research Center on Aging, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

³Department of Medicine, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

⁴Mécanismes Adaptatifs et Évolution, NHN-CNRS, Brunoy, France

⁵Division of Nuclear Medicine, Department of Radiology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Author for correspondence and reprints:

Current Address:

Dr. François Bénard

BC Cancer Agency

675 West 10th Avenue

Vancouver, BC V5Z 1L3

E-mail : fbenard@bccrc.ca

First author:

Etienne Croteau

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology

Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. (819) 346-1110 ext. 11868 Fax (819) 829-3238

E-mail: Etienne.Croteau@USherbrooke.ca

Abstract

Objectives: Despite current advances in PET/CT systems, blood sampling still remains the standard method to obtain the radiotracer input function for tracer kinetic modeling. The purpose of this study was to validate the use of image derived input functions (IDIF) of the carotid and femoral arteries to measure the arterial input function (AIF) in PET imaging. The data was obtained from two different research studies, one using ^{18}F -FDG for brain imaging and in the other ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluoro-6-thia-heptadecanoic acid (^{18}F -FTHA) in femoral muscles.

Methods: The method was validated with two phantom systems. First, a static phantom consisting of syringes of different diameters containing radioactivity was used to determine recovery coefficient (RC) and spill-in factors. Second, a dynamic phantom built to model bolus injection and clearance of tracers was used to establish the correlation between blood sampling, AIF and IDIF. The RC was then applied to the femoral artery data from PET imaging studies with ^{11}C -acetate and ^{18}F -FTHA and to carotid artery data from brain imaging with ^{18}F -FDG. These IDIF data were then compared to actual AIFs from the patients.

Results: With ^{11}C -acetate, the perfusion index in the femoral muscle was $0.34 \pm 0.18 \text{ min}^{-1}$ when estimated from the actual time activity blood curve (TAC), $0.29 \pm 0.15 \text{ min}^{-1}$ when estimated from the corrected IDIF, and $0.66 \pm 0.41 \text{ min}^{-1}$ when the IDIF data were not corrected for RC. A one way repeated measures (ANOVA) and Tukey's test showed a statistical difference for the IDIF not corrected for RC ($p < 0.0001$). With ^{18}F -FTHA there was a strong correlation between Patlak slopes, the plasma to tissue transfer rate calculated using the true plasma radioactivity content and the corrected IDIF for the femoral muscles (*Vastus Lateralis* $r = 0.86$, $p = 0.027$; *Femoris Biceps* $r = 0.90$, $p = 0.017$). On the other hand, there was no correlation between the

values derived using the AIF and the uncorrected IDIF. Finally, in the brain imaging study with ^{18}F -FDG, the cerebral metabolic rate of glucose (CMR_{glc}) measured using the uncorrected IDIF was consistently overestimated. The CMR_{glc} obtained using blood sampling was 13.1 ± 3.9 mg/100 g/min and 14.0 ± 5.7 mg/100 g/min using the corrected IDIF ($r^2 = 0.90$).

Conclusions: Correctly obtained, carotid and femoral artery IDIFs can be used as a substitute for AIFs to perform tracer kinetic modeling in skeletal femoral muscles and brain analyses.

Key Words: Positron emission tomography, tracer kinetic modeling, image-derived input function.

Abbreviation list:

AIF:	Arterial input function
CMRglc:	Cerebral metabolic rate of glucose
FDG:	Fluorodeoxyglucose
FTHA:	fluorothioheptadecanoic acid
IDIF:	Image derived input function
PVE:	Partial volume effect
RC:	Recovery coefficient
ROI:	Region of interest
TAC:	Time activity curve

Introduction

PET is an important tool to probe *in vivo* biochemistry and metabolism for cardiac, brain and cancer imaging (1). This has prompted the development of several new radiotracers and imaging techniques, including tracer kinetic modeling methods to quantify various physiological or biochemical parameters (2, 3, 4). While diagnostic studies in oncology commonly use the semi-quantitative standardized uptake value (SUV), a single static measurement (5, 6), metabolic research questions generally require more complex tracer kinetic modeling approaches or graphical analysis (1, 7, 8). Tracer kinetics can be used to model specific physiological or biochemical parameters and to decouple the various factors involved in tracer influx and efflux from a tissue (5, 9, 10, 11, 12).

The most common kinetic models are compartmental kinetic modeling (5, 13) and graphical analysis methods such as the Patlak plot, also called the Gjedde-Patlak and Patlak-Rutland plot (1, 14). Both approaches require an accurate estimation of the arterial input function (AIF), for which multiple samples of arterial blood or arterialized venous blood are needed (15, 16). Arterial access can be problematic in some subjects and has a low but still significant risk of complications (8, 9). Venous access in the hand to obtain arterialized venous blood can be difficult and it is not always possible to maintain consistent sampling, timing and volume across experiments. Multiple blood sampling requires additional staff and may be more difficult in the clinical setting or in larger scale studies.

Alternatives to multiple blood sampling exist, including general population standard curves (17) or reduction of the number of blood samples (4, 8). Indeed, in some situations, only one

blood sample may be sufficient (9). A reference tissue region of interest (ROI) such as muscle can sometimes be used to eliminate the need for an AIF (18), but in many cases such an ROI may not be available. Factorial analysis which targets well-defined parameters to which the proper kinetic function is attributed has also been used (3).

Accurate image-derived input functions (IDIF) obtained from dynamic images would greatly simplify tracer kinetic modeling or graphical methods in quantitative clinical PET studies. Since large arteries often are in the same field of view (FOV) as the target organ of interest, in principle, the AIF can be obtained directly from imaging data, much as is done in cardiac imaging using the myocardial cavity (2). Indeed, the use of carotid arteries to obtain the IDIF for brain studies has already been explored by several authors (8, 19, 20, 21, 22, 23) who concluded that with proper correction for partial volume effect (PVE), IDIF can be a suitable alternative to AIF.

Hence, the purpose of the present study was to thoroughly validate the use of the IDIF and calculate suitable factors for PVE correction of an artery's diameter. This was done using two different phantoms to mimic blood vessels of various sizes and to model the AIF. Our human data were acquired from studies performed on two different scanners, a Gemini GXL (24) and a Gemini TF "time of flight" PET/CT (25), such that the validation was performed for both scanners taking into account their properties and the nature of the radioisotopes. We then applied the derived correction factors to two human PET/CT studies in which AIFs had been obtained from arterialized venous blood samples.

Material and methods

Phantoms:

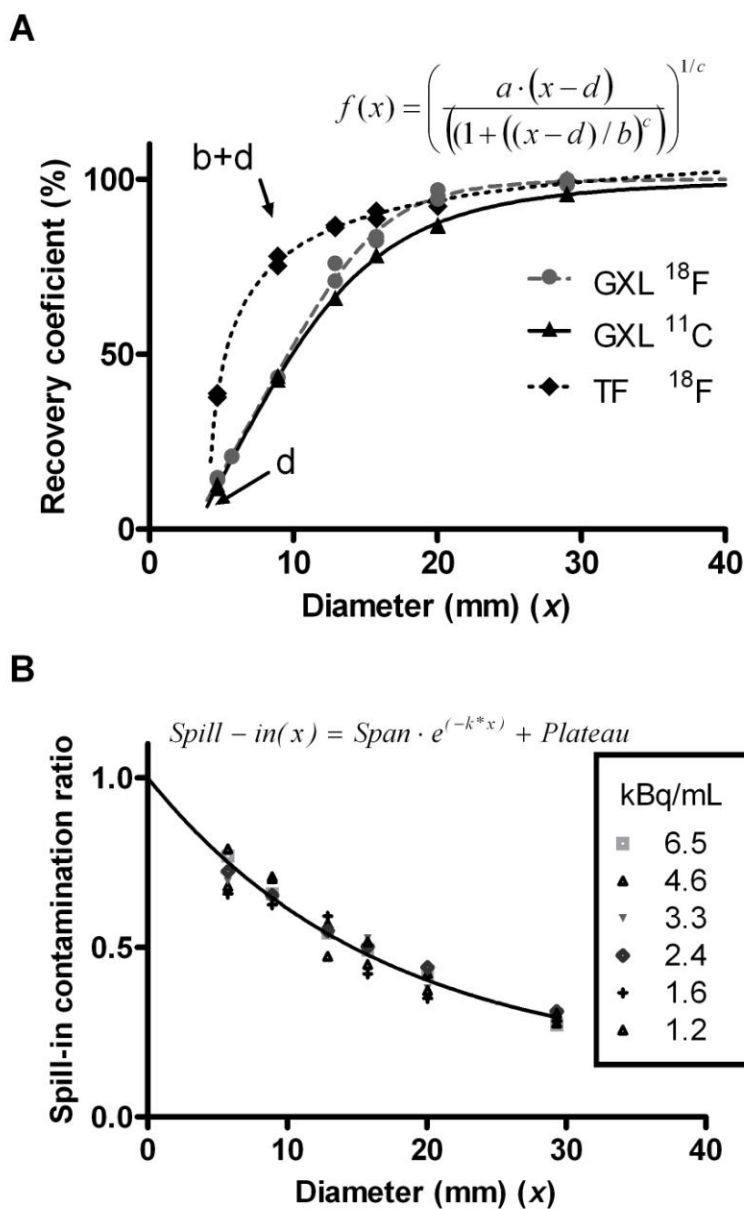
Two different phantoms were used to develop our IDIF method: one to validate the measurement of radioactivity as a function of arterial diameter, including PVE and spill-in effect, and one to simulate the kinetics of a bolus tracer injection into the arterial system. The first phantom consisted of six syringes ranging in diameter from 4.7 to 29 mm (1 to 60 cc). These syringes were immersed in a plexiglas cylinder (diameter 19.9 cm, length 30 cm) filled with water to represent the attenuation and scattering environment of the patient. Artery size and IDIF phantom studies were repeated for both the Philips Gemini GXL and the Philips Gemini TF scanners with [^{11}C] and [^{18}F] at a concentration of 0.07 ± 0.03 MBq/mL using the same acquisition parameters as for the human studies (see below). The spill-in factors were calculated using cold syringes immersed in a radioactive water cylinder ranging between 6.0 and 1.0 kBq/mL for the represent muscle radioactivity contamination.

The first aim of the static phantom study was to determine the recovery coefficient (RC) as a function of object diameter for each scanner (26) (Figure 1). Briefly, once the images were reconstructed, three ROIs were drawn on each syringe in the transaxial planes, and then for each ROI the maximum value of the four highest adjacent pixels was recorded and fitted to Equation 1 to obtain the RC as a function of object diameter x (Figure 1).

$$RC(x) = a \cdot (x - d) / (1 + ((x - d) / b)^c)^{1/c} \quad \text{Eq. 1}$$

The parameters a and d in Eq.1 represent the slope of the curve and the lower limit of the object's diameter which may be corrected adequately, respectively. The inflexion point on the shoulder of the curve ($b+d$) corresponds to the upper limit of the RC curve above which corrections for partial volume effects are no longer required.

FIGURE 1

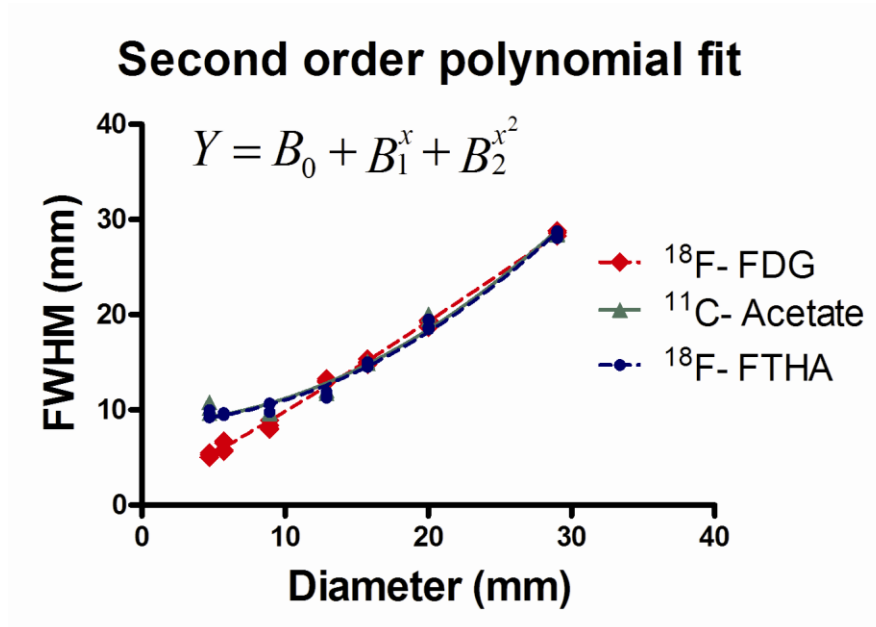


The static arterial phantom was used to obtain the recovery coefficients for cylindrical objects (syringes) ranging in diameter from 4 to 29 mm (a) and equations to calculate the spill-in ratio (b). a The phantom was imaged on the Philips Gemini TF PET/CT scanner with ^{18}F (dashed line, diamonds) and on the Gemini GXL PET/CT scanner with ^{11}C (solid line, triangles) and with ^{18}F (dotted line, circles). These data were then fitted using Eq. 1 (solid lines). b Symbols represent a series of activities and the exponential fit to the data.

We observed the same dimension between CT images diameter and the object. Therefore the value could be directly used. However, the relationship between the full width at half maximum (FWHM) of the object measured on the PET images and the actual size of the target (syringe diameter) was evaluated using a second order polynomial fit (quadratic equation) (Figure 2):

$$f(x) = B_0 + B_1 x + B_2 x^2 \quad \text{Eq. 3}$$

Figure 2



Correlation between FWHM measured in the PET images using an activity profile across the center of the syringes and the actual diameter of the static arterial phantom syringes. Lines represent the fits: for the ¹⁸F-FDG brain imaging protocol with 2-mm voxels on the Gemini TF PET/CT scanner (*dotted line, circles*), and for ¹¹C-acetate (*solid line, squares*).

and ¹⁸F-FTHA with a whole-body protocol and 4-mm voxels on the Gemini GXL PET/CT scanner (*dashed line, crosses*)

The second aim was to accurately determine the spill-in correction factors as a function of object diameter (Figure 1a). Contamination from outside the syringe represents spill-in at an exponential rate into the lumen as a function of the diameter. ROIs were drawn on the transaxial plane of each syringe and the average results were fitted to Equation 2 for the spill-in factor of the object's diameter (Figure 1b).

$$Spill-in(x) = (-Plateau) \cdot e^{(-k \cdot x)} + Plateau \quad \text{Eq. 2}$$

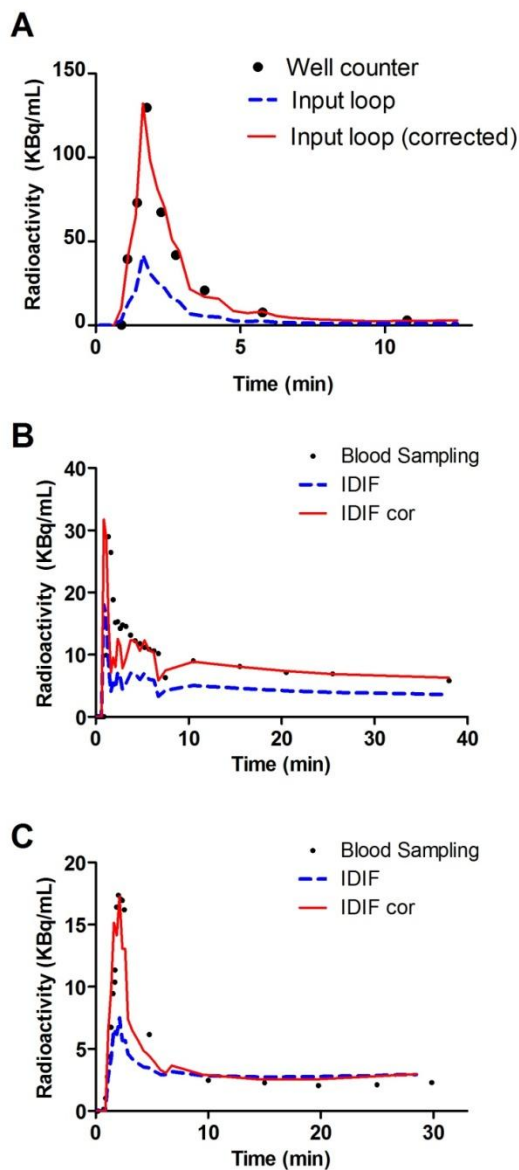
The mono-exponential equation is described by a rate constant k , the object's diameter (x), the plateau corresponding to the lower limit constant and the ratio factor contribution ($Spill-in(x)$).

Most of the phantoms used to image arteries have a diameter of 6.35 mm to simulate a carotid artery and 6.35 mm or 7.94 mm for a superficial femoral artery (27). In the present study, we used a diameter of 6.35 mm to represent both the carotid and femoral artery diameters. This was based on reported values measured by CT, Doppler, pathological examination and MRI, in which these arteries ranged from 4.4 to 12 mm, with a mean diameter of 7 mm (27,28,29,30). It is however, important to keep in mind that artery diameter varies from person to person according to factors such as age, sex, and weight (31).

For our three imaging protocols, we set blood flow within the dynamic phantom to 200 mL/min for both the femoral and the carotid arteries. This rate compares well with the actual flow rate reported for the superficial femoral artery (196 ± 65 mL/min) (32) and carotid artery (251 ± 51 mL/min) (33). This was done with a phantom designed to simulate arterial blood flow in muscle; the phantom consisted of Tygon tubing immersed in a water bath representing the muscle surrounding the artery. One end of the tube was attached to a reservoir in which the concentration of radiotracer was controlled. Blood circulation was simulated by pumping water at a constant rate of 200 mL/min through the field of view (FOV) of the PET scanner. To model blood flow following bolus injection, we started with an initial volume of 400 mL of water in the reservoir and then poured 200 mL of radiotracer solution into the reservoir over a 1 minute period. Water was then added to the reservoir at a rate of 400 mL/min to represent the blood clearance of the radiotracer. Samples were taken from the reservoir at time intervals of 20 sec,

40 sec, 60 sec, 2 min, 3 min, 5 min and 10 min to simulate blood sampling in patients, and their radioactivity was measured in a gamma counter (Cobra). Since this is considered to be equivalent to performing blood sampling in a patient, it was our gold standard for phantom measurements (Figure 3a).

FIGURE 3



Time-activity curves of input functions from withdrawn samples and the IDIF with the appropriate correction. **a** Dynamic artery phantom designed to model radiotracer influx and blood clearance. The phantom was made from Tygon tubing, 6.35 mm diameter, entering the PET scanner field of view and attached to a water reservoir used to introduce the radiotracer into the system. Samples taken from the phantom (*solid circles*) were used as reference and were compared to data obtained from uncorrected IDIF (*dashed line*) and the IDIF-corrected for partial volume using the corresponding diameter estimated from the FWHM (*solid line*). Examples of input function for **b** a ^{18}F -FDG brain study and **c** for a ^{18}F -FTHA muscle study (*solid circles blood samples, dashed line IDIF not corrected, solid line IDIF corrected*)

The radioactivity in the simulated blood samples taken from the reservoir was expressed in kBq/mL and was correlated to the IDIF derived from PET imaging of the dynamic phantom after proper correction with RCs. Three transaxial ROIs were drawn on adjacent axial plane and the maximum value of the four highest adjacent pixels was recorded. The maximum concentration of radiotracer in the carotid phantom (20 - 40 kBq/mL) was similar to what was administered to subjects during our clinical studies. In order to establish the reliability of the FWHM correction method under different conditions, the arterial injection modeling experiments were repeated three times for each protocol.

Human studies:

The data for the present analysis came from two different clinical research projects that took place in our PET facility. One was a dynamic analysis of femoral muscle metabolism in diabetic patients while the other evaluated brain glucose metabolism in young and elderly subjects. In the first study, six healthy volunteers, all men aged 37 ± 13 years, were imaged first with 185 MBq of ^{11}C -acetate for 30 min in dynamic list-mode and then with 185 MBq of the fatty acid analog ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid (FTHA) for another 50 min, again using dynamic list-mode acquisition. This study was carried out with a Philips Gemini GXL PET scanner using a row action maximum likelihood algorithm (RAMLA) without sinogram rebinning for reconstructing images and a time sequence of 12×15 sec, 8×30 sec, and 3×60 sec, with the remaining acquisitions being reconstructed with 5 min time frames. The other parameters were as follows: isotropic voxel size of 4 mm, 60 cm diameter by 18 cm axial FOV. All IDIF and the FWHM were drawn on both the left and right arteries over three consecutive planes, with an interval of 4

cm between planes. The maximum value of the four highest adjacent pixels (SUV peak) for each frames were recorded.

In the second study, the cerebral metabolic rate of glucose (CMR_{glc}) was measured with ¹⁸F-FDG in six healthy volunteers, 5 males and 1 female aged 59 ± 23 years. These scans were performed on a Philips Gemini TF scanner using list mode, with time-of-flight enabled, with the same time frames and parameters as the first study except for the images reconstruction algorithm (LOR RAMLA) and the size of the isotropic voxel, which was 2 mm. For the carotid arteries, the ROIs were drawn from the PET/CT co-registration images. For each artery, three adjacent planes were selected below the skull, their x and y diameter was then measured from the CT images and the maximum value of the four highest adjacent pixels (SUV peak) for each plane was recorded. Serial blood sampling was done for both studies following the same time points as the dynamic sequence, 12×15 sec, 8×30 sec, 3×60 sec, and all subsequent samples were withdrawn every 5 min. The arterialized venous blood was withdrawn with retrograde insertion of a cannula into a dorsal arm or a distal forearm vein. The limb was kept warm with a heating blanket.

PET data analysis:

In the first study, the muscle perfusion index K_1 (min^{-1}) was estimated from ^{11}C -acetate using a three compartment model (11, 34):

$$C_t(t) = [A_1 \cdot \exp(-(k_2 + k_3)t) + A_2 \cdot \exp(-k_4t)] \otimes C_p(t) + v \cdot C_{tot}(t) \quad \text{Eq. 4}$$

$$A_1 = K_1 k_2 / (k_2 + k_3)$$

$$A_2 = K_1 k_3 / (k_2 + k_3)$$

In equations 4, C_t , C_p and C_{tot} represent the time dependence of the tracer concentration in tissue, plasma and the total arterial blood, respectively. K_1 to k_4 are the rate constants and v represents the blood volume. In this equation, K_1 represents blood flow, while k_2 is an index of myocardial oxygen consumption (MVO_2).

The contribution of ^{11}C -acetate metabolites to the radioactivity measured in the plasma was estimated as follows:

$$C_p(t) = [1 - a_0 \cdot (1 - \exp(-t \cdot \log 2 / m))] \cdot C_{tot}(t) \quad \text{Eq. 5}$$

In Eq.5, the variables a_0 and m are the parameters to be fitted.

For the ^{18}F -FTHA data, in order to compare the IDIF obtained from the ROIs to the actual plasma samples taken from the subjects, we first corrected for the PVE (Eq. 1) corresponding to the artery diameter estimated from the FWHM of the radioactivity profile. Then, a second correction was applied for the spill-in of radioactivity from muscle into the artery lumen in the late portion of the time activity curve (TAC). This was repeated with the corresponding factor for

the diameter observed (Figure 1b), multiplied by each point of the muscle activity and subtracted from the TAC where the activity of the muscle in the late portion is higher or equal to the artery's lumen (Figure 3b). This approach for spill-in correction was compared to another technique where a blood sample is required. This was achieved by subtracting the value of the last point of the ROIs TAC from the corresponding blood sample radioactivity, thereby obtaining the amount of unwanted radioactivity originating from muscle tissue. This value was then divided by the muscle radioactivity content estimated from the PET image, with the resulting fractional factor subsequently used to correct the late portion of the TAC (35). Both approaches yielded similar results ($r^2 = 0.99$) (Figure 5d). Lastly, the data were corrected for the presence of ^{18}F -FTHA metabolites in the blood. To comply with our kinetic model, the quantitative (kBq/mL) values were obtained for whole blood and converted to plasma values using a constant factor derived from the subjects' blood samples. With these corrections, the plasma to tissue transfer rate, K_i , was obtained using a Patlak graphical analysis for irreversible ligands (Eq. 6) (14, 36).

$$K_i = \frac{K_1 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \quad \text{Eq. 6}$$

The transfer of the tracer from plasma to the irreversible compartment (K_i) was estimated from Eq. 7

$$\frac{C(t)}{C_p(t)} = K_i \frac{\int_0^t C_p(t) dt}{C_p(t)} + V_d \quad \text{Eq. 7}$$

Because equation 7 is linear at equilibrium (5 - 35 min) (37), the fractional uptake constant (K_i) can be derived directly from the slope of the curve of $C_t(T)/C_p(T)$ against $C_p(T)$ divided by the integral of the plasma TAC - $C_p(T)$.

In the second study, we used the classical three compartment model (Eq. 8) to estimate $CMRglc$ as originally described by Sokoloff et al. (37), a method which was validated for ^{18}F -FDG studies in the human brain (13).

$$CMRglc = \frac{C_p}{LC} \cdot \frac{K_1 \cdot k_2}{k_2 + k_3} \quad \text{Eq. 8}$$

where $CMRglc$ is in mg/100 g/min., C_p is the plasma glucose concentration, LC is the lumped constant (0.52) (38), k_1 and k_2 are the rate constants for carrier-mediated transport of ^{18}F -FDG between plasma and tissue and k_3 is the phosphorylation rate constant of ^{18}F -FDG at steady state. The IDIF were only corrected for the partial volume, correction for spill-in was not necessary as the carotids ROIs are located outside of the skull where they are exempted from brain radioactivity contamination (23). We used a large ROI, for the brain tissue, traced on the frontal lobe of the brain without using a morphological atlas to estimate $CMRglc$.

Statistical analysis.

All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Pearson correlation coefficients (r) and the determination coefficients (r^2) were used to evaluate the strength of the relationship between the diameter of the arterial phantom syringes, the FWHM obtained by PET and artery dimensions obtained by CT. For the human studies, the Pearson correlation and determination coefficients were used to assess the relationship between the IDIF, spill-in factor correction, Tygon tubing size, measurements obtained from the subjects and phantom blood clearance curves. For the brain study, arterial dimension and FWHM from the PET activity profiles were compared using a paired t -test. One way repeated measures (ANOVA) with Tukey's test was used to assess the differences between the blood sampling data, the IDIF not corrected for partial volume effects and the IDIF corrected for partial volume effects in the clinical studies. All p values smaller or equal to 0.05 were considered statistically significant.

Results

The RC curves for each type of study and scanner from the phantom measurements are shown in Figure 1. To define our correction domain, we set the upper limit for the RC at 90%, while the lower limit below which the correction is a constant factor, was set by the value of “ d ” in equation 1.

We also measured the relationship between the FWHM obtained from PET images and the true diameter of the targets. This relationship between the PET-derived FWHM and actual phantom syringe size was needed, since without contrast agents it was not possible to reliably measure the diameter of the superficial femoral artery directly using the CT images from the PET/CT scanner in this study. Fitting the data from the phantom to a second order polynomial equation, we found a highly significant correlation ($r^2 > 0.98$) between the PET measured FWHM and the real diameter of the simulated arteries. With a regression curve, the standard deviation of the residuals (S_{xy}) was 0.9 mm for ^{11}C -acetate, 0.6 mm for ^{18}F -FTHA and 0.5 mm for ^{18}F -FDG (Figure 2).

Further validation of the second order polynomial equation fit model was obtained from the 6.35 mm inner diameter tube of the dynamic femoral phantom. All validations were in triplicate for each scanner and study conditions.

TABLE 1

Recovery coefficient and the corresponding diameter estimated from the FWHM measured in the PET image.

Radiotracer		Diameter (mm)	Recovery Coefficient	r^2 value ^c
¹⁸ F-FDG	Patient ^a	7.93 ± 0.46	0.58 ± 0.02	0.975
	Phantom ^b	6.65 ± 0.44	0.49 ± 0.03	
¹¹ C-Acetate	Patient ^a	9.63 ± 0.78	0.52 ± 0.08	0.940
	Phantom ^b	6.77 ± 0.12	0.28 ± 0.01	
¹⁸ F-FTHA	Patient ^a	9.48 ± 1.21	0.49 ± 0.09	0.990
	Phantom ^b	6.21 ± 0.13	0.25 ± 0.01	

^a : Human studies (N=6)
^b : Dynamic phantom (tube diameter = 6.35 mm) (N=3)
^c : Correlation of the IDIF with the radioactivity of the samples from the phantom reservoir

¹¹C-Acetate overestimated the size of the target (6.35 mm tubing) by $6 \pm 2\%$, while underestimation with ¹⁸F-FTHA was less ($3 \pm 2\%$). For the brain study with ¹⁸F-FDG on the Gemini TF, the carotid artery diameter was slightly overestimated ($4 \pm 7\%$) and the data were more variable.

For the brain study, the diameter of the left and right median carotid arteries was estimated from the PET image after a ¹⁸F-FDG bolus injection. From the co-registered PET/CT image, it was also possible to locate the arteries on the CT image and measure their diameter.

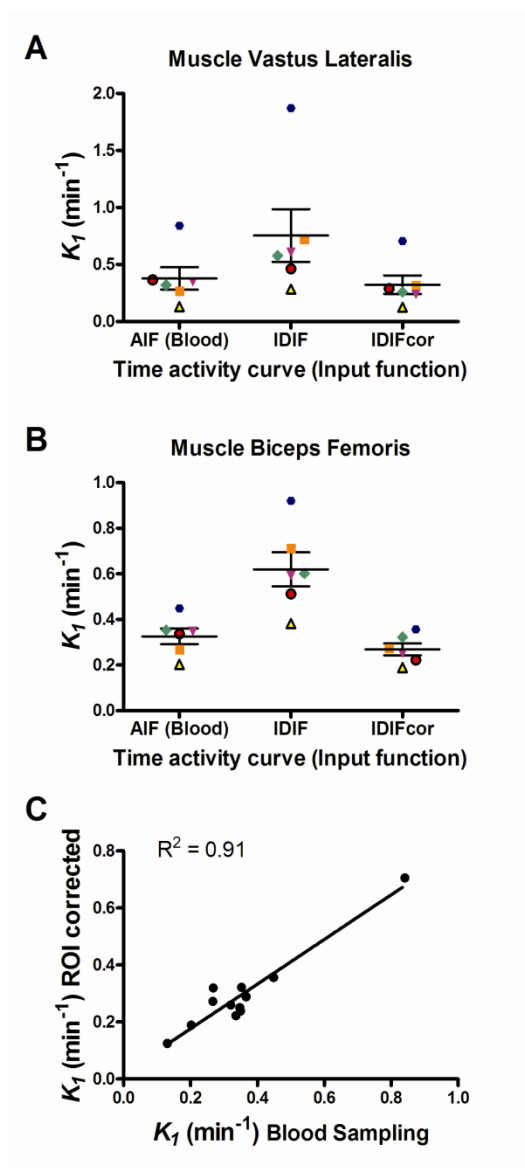
The measured values were not statistically different: 7.3 ± 0.6 mm by PET and 7.9 ± 0.5 mm by CT (paired Student *t*-test; $p = 0.08$). Consequently, there was no significant difference in the recovery coefficients extracted using PET or CT images (0.54 ± 0.04 vs 0.58 ± 0.03 ; $p = 0.24$).

Similarly, there was no significant difference in CMRglc 14.0 ± 5.7 vs 13.4 ± 5.6 ; $p = 0.18$ using the two artery size measurement methods.

The dynamic femoral phantom was designed to simulate the influx and subsequent clearance of a bolus injection of radiotracer in an artery (Figure 3a), as well as to model the blood clearance curve. Here also, all measurements were performed in triplicate for each protocol. The radioactivity data obtained from sampling of the radioactive solution in the phantom reservoir were first converted into kBq/mL and then correlated with the phantom PET data, corrected for the PVE using RC corresponding to the tube inner diameter of 6.35 mm. The following coefficients of determination (r^2) were obtained: Gemini GXL with whole body protocol for ^{11}C -acetate ($r^2 = 0.94$), for ^{18}F -FTHA ($r^2 = 0.99$); Gemini TF with brain study protocol for ^{18}F -FDG ($r^2 = 0.98$).

The correction methods developed with the phantoms were then applied to actual human femoral artery data. With ^{11}C -acetate, the perfusion index, K_1 (min^{-1}), was obtained independently for both the *vastus lateralis* and the *biceps femoris* muscles using a three compartment model.

FIGURE 4

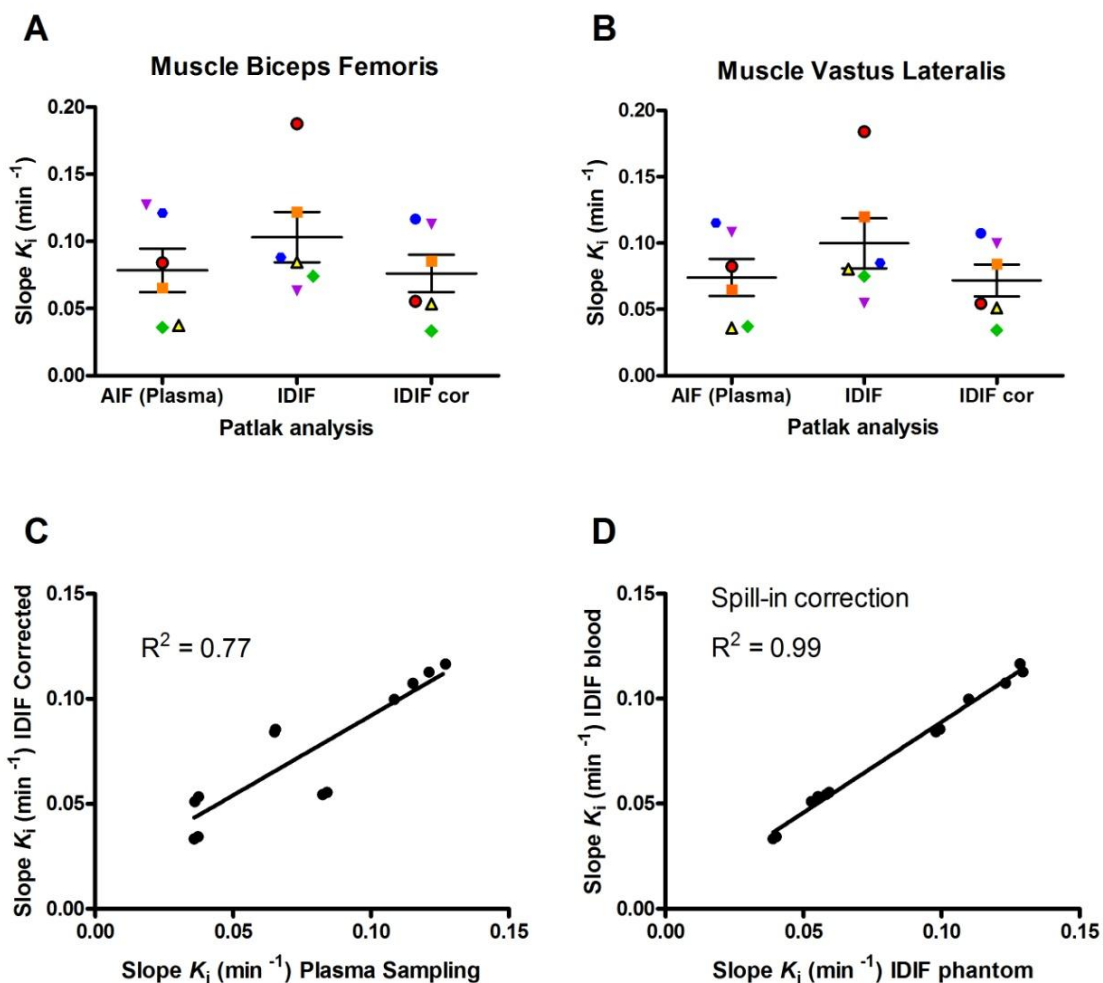


a, b ^{11}C -acetate perfusion index, K_1 , for the vastus lateralis (a) and biceps femoris (b) obtained by kinetic analysis with a three compartment model. For each muscle, the average and range of K_1 values were obtained from an AIF derived by blood sampling (*Blood*), IDIF and corrected for PVE (*IDIFcor*). **c** The K_1 values obtained from blood sampling are also correlated with the corrected IDIF values. The data from each subject are identified by the same symbol across all conditions.

The perfusion index for both muscles was not statistically different when estimated from the blood TAC ($0.34 \pm 0.18 \text{ min}^{-1}$) compared to the corrected IDIF ($0.29 \pm 0.15 \text{ min}^{-1}$). However, the uncorrected IDIF yielded perfusion index values of $0.66 \pm 0.41 \text{ min}^{-1}$ that were significantly overestimated compared to those obtained from the blood TAC or with the corrected IDIF repeated measures ANOVA ($p < 0.0001$).

For the ^{18}F -FTHA study, the muscle (*vastus lateralis*, *femoris biceps*) to plasma transfer rate constant (K_i) was computed from a Patlak graphical analysis (Figure 5), yielding the following values: AIF from the plasma samples ($K_i = 0.076 \pm 0.035 \text{ min}^{-1}$), IDIF corrected for the PVE and the spillover from the muscle ($K_i = 0.074 \pm 0.031 \text{ min}^{-1}$) and uncorrected IDIF ($K_i = 0.102 \pm 0.044 \text{ min}^{-1}$). There was a significant positive correlation ($r = 0.86$, $p=0.027$ for *vastus lateralis*; $r = 0.89$, $p=0.017$ for *biceps femoris*) between the slopes of the corrected data and the actual plasma radioactivity AIF. However, there was no correlation ($r = 0.04$ for *vastus lateralis* and $r = 0.002$ for *biceps femoris*) between the slopes of the Patlak curves derived from the AIF and the uncorrected IDIF.

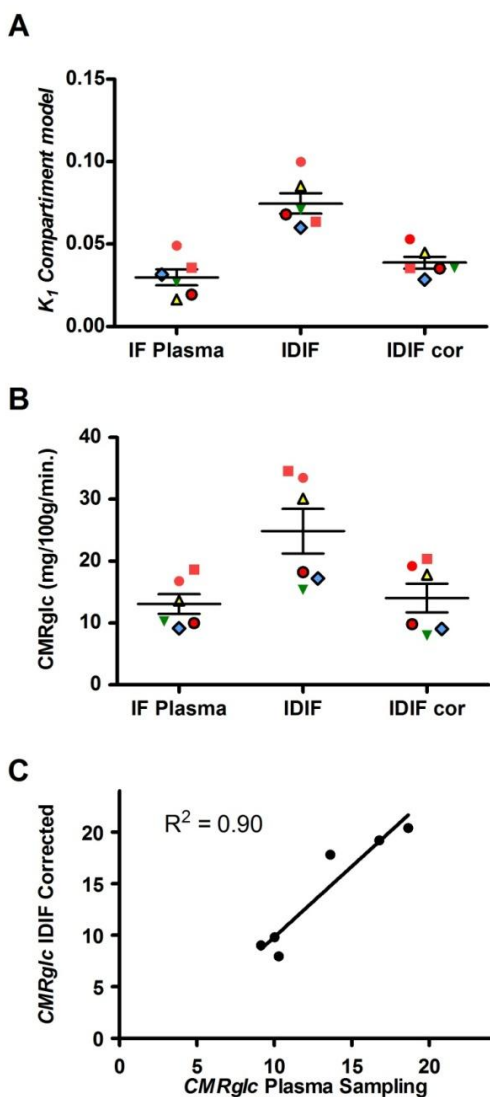
FIGURE 5



a, b Slope of the plasma to tissue transfer rate, K_i (min^{-1}), of ^{18}F -FTHA for the vastus lateralis (**a**) and biceps femoris (**b**) obtained by Patlak graphical analysis. For each muscle, the average and range of K_i was obtained from an AIF derived from blood sampling (*Plasma*), uncorrected IDIF and corrected for PVE and spillover (*IDIF cor*). The data from each patient are identified by the same symbol across all conditions. **c** The K_i values obtained from blood sampling are correlated with the corrected IDIF values. **d** The values of K_i measured using IDIF corrected for spill-in with the late blood sample are correlated with the K_i measured using IDIF corrected for spill-in with the static phantom-derived function.

In the ^{18}F -FDG brain imaging study, a standard compartmental analysis was applied using the frontal brain region for the tissue, and the blood curve was obtained using blood samples, the uncorrected IDIF and the IDIF corrected for PVE (Figure 6). K_1 values were $0.029 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$, $0.076 \pm 0.014 \text{ min}^{-1}$ and $0.039 \pm 0.007 \text{ min}^{-1}$, respectively. The average $CMRglc$ values for the frontal brain were obtained from each input function: blood samples $13.8 \pm 3.9 \text{ mg}/100 \text{ g}/\text{min}$, IDIF without corrections $24.8 \pm 8.8 \text{ mg}/100 \text{ g}/\text{min}$ and IDIF corrected for partial volume $14.0 \pm 5.7 \text{ mg}/100 \text{ g}/\text{min}$. Thus, omitting the corrections for partial volume resulted in an overestimation of the $CMRglc$ by a factor of approximately two. One way ANOVA repeated measures and Tukey's test revealed statistical differences for the K_1 and $CMRglc$ only for the IDIF not corrected for PVE ($F(2,5) = 48.37$; $p < 0.0001$) and ($F(2,5) = 36.42$; $p < 0.0001$).

FIGURE 6



CMRglc from standard three-compartment model analyses of ^{18}F -FDG dynamic brain imaging, using an ROI on the frontal lobe of the brain. **a** The K_1 determined from the compartment model computed using three different input functions: plasma sampling (*Plasma*), IDIF without correction, and IDIF corrected for carotid artery PVE (*IDIF cor*). **b** CMRglc was computed using three different input functions: plasma sampling (*Plasma*), IDIF without correction, and IDIF corrected for carotid artery partial volume (*IDIF cor*). For each subject, the diameter of the carotid artery was obtained from the bolus PET/CT coregistration images by measuring artery size on the CT image. The data from each patient are identified by the same symbol across all conditions. **c** Correlation between CMRglc of the frontal brain region derived from plasma sampling and from IDIF corrected for PVE.

In order to establish the robustness of the correction when applied to human studies, we assessed the impact of corrections for PVEs assuming differences of ± 1 mm between the real and measured artery sizes. For the ^{11}C -acetate muscle study, underestimating the femoral artery size by 1 mm resulted in an underestimation of the perfusion index by $67 \pm 6\%$; if the size was overestimated by 1 mm, the perfusion index was overestimated by $66 \pm 9\%$. A similar but less important effect was observed with ^{18}F -FTHA where the effect on K_i for a 1 mm underestimation and overestimation was $-13 \pm 6\%$ and $+12 \pm 6\%$, respectively. Although a ± 1 mm error is unlikely because of the excellent spatial resolution of CT, we were nonetheless interested in computing the effect of such a deviation on the estimation of the CMRglc by CT. It was found that an underestimation of the diameter of the carotid artery by 1 mm would decrease the CMRglc by $17\% \pm 6\%$ whereas an overestimation by 1 mm would increase it by $10 \pm 3\%$.

Discussion

We report here two specific developments: (1) methods for PVE correction appropriate for the PET camera, isotopes, acquisition protocols and kinetic reconstruction, and (2) an excellent correlation between AIF and IDIF obtained on the same subjects, based on the results from experiments conducted using a static phantom to measure recovery coefficients for blood vessels of various sizes and a dynamic phantom modeling the AIF. We already know that kinetic analysis yields important information that cannot be obtained from static images. In cardiac imaging for example, kinetic analysis of ^{11}C -acetate PET data is useful to measure myocardial perfusion and oxygen consumption (39, 40). Similarly, CMRglc can only be obtained using tracer kinetic analysis (8). One of the main limitations of kinetic analyses is the necessity to

draw serial arterial or arterialized blood samples to obtain the blood input function required by the mathematical models (1). Other strategies exist to bypass this requirement (8, 19, 20, 21, 22, 23), but the use of an IDIF is attractive for several reasons. First, it eliminates a common source of error - the need for precise cross-calibration between a dose calibrator and the PET scanner. Second, by providing the equivalent of an AIF without blood sampling during the acquisition, IDIF makes the study simpler, with reduced risk and discomfort for the subject, fewer manipulations, reduced personnel requirements, and lower risk of occupational hazards related to blood handling. Third, serial blood sampling can also be a deterrent to subject participation when venous or arterial access is problematic, i.e. in cancer patients or in the elderly.

Despite its intrinsic utility, IDIF has some limitations. The first is the need to correct for PVEs. Because of the difficulty in obtaining reliable data from arterial imaging, IDIF was for a long time restricted to the left ventricle, which offers a relatively large pool of arterial blood in myocardial imaging studies (36). Now that most human PET/CT scanners can achieve a spatial resolution <5 mm, IDIF analysis can be considered for large blood vessels such as the femoral or the carotid arteries (23). Accurate determination of the diameter of large arteries by PET/CT allows for the computation of reliable RCs, making it possible to obtain the equivalent of AIFs directly from the ROIs traced on the PET/CT images of these arteries. The availability of more sensitive scanners and the feasibility of using list mode along with better reconstruction algorithms have also contributed to the improvement of spatial and time resolution, and thus, to the quality of radiotracer kinetic analysis.

PVE is also a key challenge in obtaining an accurate IDIF. In 1984, Kessler et al. (41) were among the first to propose a correction scheme for PVE which took into account the impact of

the scanner's physical characteristics. In the present study, emphasis was placed on the reconstructed image, since the scanner characteristics, the nature of the radiotracer and blood vessel diameter are implicitly present in the data derived from the image. Accordingly, the mathematical expressions we used to correct for PVE were directly derived from the images obtained in each study, making it easier to integrate the scanner's characteristics while computing the RCs.

When dealing with RCs, the behaviour of cylindrical objects such as arteries is quite different from that of spherical shape, since shape has an effect on voxel overlap (42). Thus, cylindrical rather than usual spherical phantoms were selected to properly simulate blood vessel geometry. In this study, phantom measurements confirmed that the combination of CT and PET images within the same investigation can improve the measurement of target size and spatial position compared to conventional PET without CT.

Once the proper artery diameter was established, the data from the dynamic PET acquisition were validated against the water reservoir samples. Each protocol was evaluated, since ^{11}C has a longer positron range than ^{18}F ; this likely explains the less precise size estimate with ^{11}C . The FDG study was performed using a different scanner (Gemini TF instead of Gemini GXL), with a higher spatial resolution and smaller voxels for the brain acquisition protocol. The more precise size estimates obtained with ^{18}F -FDG compared to ^{18}F -FTHA are therefore most likely due to hardware and not to the radiotracer.

Blood sampling is widely considered to be the gold standard for AIF, but blood samples are almost exclusively taken from the extremity of the upper limbs. This means that the sampling site is often quite remote from the target organ, requiring one to assume that the blood tracer

concentration within the arterial network is homogenous. However, when the AIF is obtained by IDIF, one can select a blood vessel close to the target organ, which is more representative of the true tracer input to the target organ.

The IDIF obtained from PET data represents whole blood activity and a partition coefficient must be assumed to provide the plasma input function. There is now, however, a tendency to prefer whole blood to calculate the AIF, as this makes the experiment simpler and also yields reliable results (43). Since the clinical studies were at the pilot stage, our analysis is not powered to detect substantial differences between the various blood analysis methods. The fact that we did detect a substantial difference between the uncorrected IDIF and the blood samples shows that proper correction methods must be applied to the IDIF. While we observed a good general agreement between the values provided by corrected IDIF and blood samples, further studies will be needed on larger data sets to properly document the difference between corrected IDIF and blood samples.

The kinetic model used for our ^{11}C -acetate PET measurements of heart oxygen consumption already has IDIF built into the study design whereby ROIs are traced on the left ventricular cavity. In this model, a whole blood input function is used instead of plasma sampling (26, 40). For ^{11}C -acetate kinetics with high blood flow rates, it may be appropriate to use a first pass extraction model (44), but considering that we were concerned with validating AIFs from ROIs traced on leg arteries at rest which have a low perfusion rate, our current model was assumed to be appropriate. Measurements performed with ^{13}C -acetate show that the average uptake of acetate in the leg muscle at rest is $15 \mu\text{mol min}^{-1}$, with a release rate of $5 \mu\text{mol min}^{-1}$, which accounts for

4% and 1.5% of the available acetate, respectively (45). These results make it likely that enough ^{11}C -acetate reaches the leg muscle to correctly measure its perfusion index even at rest.

For the analysis of ^{18}F -FTHA uptake in the femoral muscle, we chose the Patlak graphical analysis. Knuuti et al. (36) did a 30 min heart acquisition followed by a 15 min acquisition of the leg muscle. Plasma was collected throughout the study and corrected for the presence of metabolites. To obtain the IDIF in our study, we first measured whole blood values from the images, corrected them for the PVE, then for the spill-in, for the presence of ^{18}F -FTHA metabolites and finally derived plasma values from whole blood. Although the femoral muscle ^{11}C -acetate and brain ^{18}F -FDG study's protocol did not require the sampling of blood during the acquisition procedure, with ^{18}F -FTHA, blood samples have to be collected for the metabolites. ^{18}F -FTHA data were fitted to a one phase exponential decay to correct the IDIF. Nevertheless in the long run, we aim to reduce or even completely eliminate the need for blood sampling during ^{18}F -FTHA acquisition. However, all of our data were from patients in whom the circulating glucose level was kept constant with an euglycemic-hyperglycaemic clamp. Further experiments with normal subjects will be required before we can comment on the universality of this method. We found that uncorrected IDIF scores were inconsistent, but that correcting with the RCs significantly reduced data variability and yielded a good correlation ($r^2 = 0.78$) between results calculated using the IDIF and actual AIF. These results emphasize the importance of properly correcting IDIF before using it for further analysis.

Data based on ^{18}F -FDG SUV or kinetic models are widely used in basic and clinical research (1, 5, 8, 9). When performing IDIF studies with ^{18}F -FDG, the difference between concentrations of ^{18}F -FDG in whole blood versus plasma can be ignored as it has been shown to have little or no

impact on the final results (8). Many studies have been conducted to eliminate the need for serial blood sampling (4, 8, 9, 17) during image acquisition, but most methods still require at least one blood sample to calibrate the input curve with the blood radioactivity concentration. For example, Chen et al., used a combination of blood samples and independent component analysis to obtain the input function [20]. Mourik et al. found a good agreement when using IDIF calibrated with a blood sample, but had poorer results when using an IDIF corrected with RCs, perhaps due to the method used to measure the RC [22]. A similar approach was used by de Geus-Oei et al. [46].

A major challenge in measuring IDIF is to obtain a proper RC for the reference artery. To assess the robustness of our method to measure arterial diameter, we computed the impact of a +/- 1mm error on the IDIF values. Even with a 1 mm deviation, the derived IDIF remained closer to the true AIF derived from the blood sampling as compared to an uncorrected IDIF value. Considering that we have computed the mean of 6 ROIs for the femoral arteries, it is very unlikely that an error as large as 1 mm would occur; such an error exceeds our experimental variability with the CT measurement which was of the order of 0.5 mm for the carotid artery. With ^{18}F -FDG, PET/CT could be used to obtain the diameter of the artery from the co-registered CT and ^{18}F -FDG bolus PET images. These images make it easy to correct the data for PVE, an important advantage of this approach.

Conclusion

The use of PET/CT imaging with correction for spillover and PVE allows for precise determination of blood radiotracer concentration in major vessels and makes it possible to extract accurate quantitative kinetic data using an IDIF. As a result, we showed that blood sampling can be avoided during the acquisition while simultaneously obtaining a precise and accurate AIF. The proposed method requires precise phantom measurements of recovery coefficients and accurate determination of artery diameter, which are procedures well within the capability of most PET imaging facilities involved in clinical research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR - MOP53094 and PRG-80137), a postgraduate Scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Canada Research Chairs Secretariat (SCC), Canadian Foundation for Innovation and Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) Scholarships (FB, ACC). ACC, SCC and RL are members of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Etienne-Le Bel.

REFERENCES

1. Logan J, Alexoff D, Kriplani A. Simplifications in analyzing positron emission tomography data: Effects on outcome measures. *Nucl Med Biol.* 2007;34:743-756.
2. van der Weerd AP, Klein LJ, Boellaard R, Visser CA, Visser FC, Lammertsma AA. Image-derived input functions for determination of MRGlu in cardiac (18)F-FDG PET scans. *J Nucl Med.* 2001;42:1622-1629.
3. Wu HM, Hoh CK, Choi Y, et al. Factor analysis for extraction of blood time-activity curves in dynamic FDG-PET studies. *J Nucl Med.* 1995;36:1714-1722.
4. Phillips RL, Chen CY, Wong DF, London ED. An improved method to calculate cerebral metabolic rates of glucose using PET. *J Nucl Med.* 1995;36:1668-1679.
5. Graham MM, Peterson LM, Hayward RM. Comparison of simplified quantitative analyses of FDG uptake. *Nucl Med Biol.* 2000;27:647-655.
6. Huang SC. Anatomy of SUV. standardized uptake value. *Nucl Med Biol.* 2000;27:643-646.
7. Ogden RT. Estimation of kinetic parameters in graphical analysis of PET imaging data. *Stat Med.* 2003;22:3557-3568.
8. Chen K, Bandy D, Reiman E, et al. Noninvasive quantification of the cerebral metabolic rate for glucose using positron emission tomography, ¹⁸F-fluoro-2-deoxyglucose, the Patlak method, and an image-derived input function. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:716-723.

9. Brock CS, Young H, Osman S, Luthra SK, Jones T, Price PM. Glucose metabolism in brain tumours can be estimated using [18F]2-fluorodeoxyglucose positron emission tomography and a population-derived input function scaled using a single arterialised venous blood sample. *Int J Oncol.* 2005;26:1377-1383.
10. Brun E, Kjellen E, Tennvall J, et al. FDG PET studies during treatment: Prediction of therapy outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2002;24:127-135.
11. Bentourkia M, Croteau E, Langlois R, et al. Cardiac studies in rats with ¹¹C-acetate and PET: A comparison with ¹³N-ammonia. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2002;49:2322-2327.
12. Maki MT, Haaparanta M, Nuutila P, et al. Free fatty acid uptake in the myocardium and skeletal muscle using fluorine-18-fluoro-6-thia-heptadecanoic acid. *J Nucl Med.* 1998;39:1320-1327.
13. Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: Validation of method. *Ann Neurol.* 1979;6:371-388.
14. Logan J. Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers. *Nucl Med Biol.* 2000;27:661-670.
15. van der Weerd AP, Klein LJ, Visser CA, Visser FC, Lammertsma AA. Use of arterialised venous instead of arterial blood for measurement of myocardial glucose metabolism during euglycaemic-hyperinsulinaemic clamping. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2002;29:663-669.

16. Syvanen S, Blomquist G, Appel L, Hammarlund-Udenaes M, Langstrom B, Bergstrom M. Predicting brain concentrations of drug using positron emission tomography and venous input: Modeling of arterial-venous concentration differences. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006;62:839-848.
17. Meyer PT, Circiumaru V, Cardi CA, Thomas DH, Bal H, Acton PD. Simplified quantification of small animal [¹⁸F]FDG PET studies using a standard arterial input function. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;33:948-954.
18. Laforest R, Sharp TL, Engelbach JA, et al. Measurement of input functions in rodents: Challenges and solutions. *Nucl Med Biol*. 2005;32:679-685.
19. Litton JE, Hall H, Blomqvist G. Improved receptor analysis in PET using a priori information from in vitro binding assays. *Phys Med Biol*. 1997;42:1653-1660.
20. Chen K, Chen X, Renaut R, et al. Characterization of the image-derived carotid artery input function using independent component analysis for the quantitation of [¹⁸F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography images. *Phys Med Biol*. 2007;52:7055-7071.
21. Su KH, Wu LC, Liu RS, Wang SJ, Chen JC. Quantification method in [¹⁸F]fluorodeoxyglucose brain positron emission tomography using independent component analysis. *Nucl Med Commun*. 2005;26:995-1004.
22. Mourik JE, Lubberink M, Schuitemaker A, et al. Image-derived input functions for PET brain studies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36:463-471.
23. Mourik JE, van Velden FH, Lubberink M, et al. Image derived input functions for dynamic high resolution research tomograph PET brain studies. *Neuroimage*. 2008;43:676-686.

24. Gregory R, Partridge M, Flower MA. Performance evaluation of the Philips "Gemini" PET. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2006;53:93-101.
25. Surti S, Kuhn A, Werner ME, Perkins AE, Kolthammer J, Karp JS. Performance of Philips Gemini TF PET/CT scanner with special consideration for its time-of-flight imaging capabilities. *J Nucl Med.* 2007;48:471-480.
26. Prevost S, Lavallee E, Croteau E, et al. Partial volume effects on SUV measurements: Impact of acquisition methods, reconstruction modes and image filtering for 2 dedicated PET scanners. *J Nucl Med.* 2003;44:985.
27. Blake JR, Meagher S, Fraser KH, Easson WJ, Hoskins PR. A method to estimate wall shear rate with a clinical ultrasound scanner. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34:760-774.
28. Radegran G, Saltin B. Human femoral artery diameter in relation to knee extensor muscle mass, peak blood flow, and oxygen uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H162-7.
29. Williams MA, Nicolaides AN. Predicting the normal dimensions of the internal and external carotid arteries from the diameter of the common carotid. *Eur J Vasc Surg.* 1987;1:91-96.
30. Olufsen MS, Peskin CS, Kim WY, Pedersen EM, Nadim A, Larsen J. Numerical simulation and experimental validation of blood flow in arteries with structured-tree outflow conditions. *Ann Biomed Eng.* 2000;28:1281-1299.
31. Sandgren T, Sonesson B, Ahlgren R, Lanne T. The diameter of the common femoral artery in healthy human: Influence of sex, age, and body size. *J Vasc Surg.* 1999;29:503-510.

32. Hussain ST, Smith RE, Wood RF, Bland M. Observer variability in volumetric blood flow measurements in leg arteries using duplex ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 1996;22:287-291.
33. Bartlett ES, Walters TD, Symons SP, Fox AJ. Carotid stenosis index revisited with direct CT angiography measurement of carotid arteries to quantify carotid stenosis. *Stroke.* 2007;38:286-291.
34. Buck A, Wolpers HG, Hutchins GD, et al. Effect of carbon-11-acetate recirculation on estimates of myocardial oxygen consumption by PET.[see comment]. *J Nucl Med.* 1991;32:1950-1957.
35. Gambhir SS, Schwaiger M, Huang SC, et al. Simple noninvasive quantification method for measuring myocardial glucose utilization in humans employing positron emission tomography and fluorine-18 deoxyglucose. *J Nucl Med.* 1989;30:359-366.
36. Maki MT, Haaparanta MT, Luotolahti MS, et al. Fatty acid uptake is preserved in chronically dysfunctional but viable myocardium. *Am J Physiol.* 1997;273:H2473-80.
37. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al. The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem.* 1977;28:897-916.
38. Reivich M, Alavi A, Wolf A, et al. Glucose metabolic rate kinetic model parameter determination in humans: The lumped constants and rate constants for [18F]fluorodeoxyglucose and [11C]deoxyglucose. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1985;5:179-192.

39. Sun KT, Yeatman LA, Buxton DB, et al. Simultaneous measurement of myocardial oxygen consumption and blood flow using [1-carbon-11]acetate. *J Nucl Med.* 1998;39:272-280.
40. van den Hoff J, Burchert W, Borner AR, et al. [1-(11)C]acetate as a quantitative perfusion tracer in myocardial PET. *J Nucl Med.* 2001;42:1174-1182.
41. Kessler RM, Ellis JR, Jr, Eden M. Analysis of emission tomographic scan data: Limitations imposed by resolution and background. *J Comput Assist Tomogr.* 1984;8:514-522.
42. Soret M, Bacharach SL, Buvat I. Partial-volume effect in PET tumor imaging. *J Nucl Med.* 2007;48:932-945.
43. Zanotti-Fregonara P, Maroy R, Comtat C, et al. Comparison of 3 methods of automated internal carotid segmentation in human brain PET studies: Application to the estimation of arterial input function. *J Nucl Med.* 2009;50:461-467.
44. Herrero P, Kim J, Sharp TL, et al. Assessment of myocardial blood flow using 15O-water and 1-11C-acetate in rats with small-animal PET. *J Nucl Med.* 2006;47:477-485.
45. van Hall G, Sacchetti M, Radegran G. Whole body and leg acetate kinetics at rest, during exercise and recovery in humans. *J Physiol (Lond).* 2002;542:263-272.

Chapitre 2.3. Réponses (en anglais) aux questions de l'évaluateur externe concernant l'article (1).

(Comments from external reviewer not addressed in text revision)

1. It is unclear whether the data were acquired in 2D or 3D mode.

The phantoms and patients experiments were all 3D acquisitions.

2. There is no comment made on the affect of the camera dead-time and scatter correction on the recovery co-efficient nor the spill-in correction.

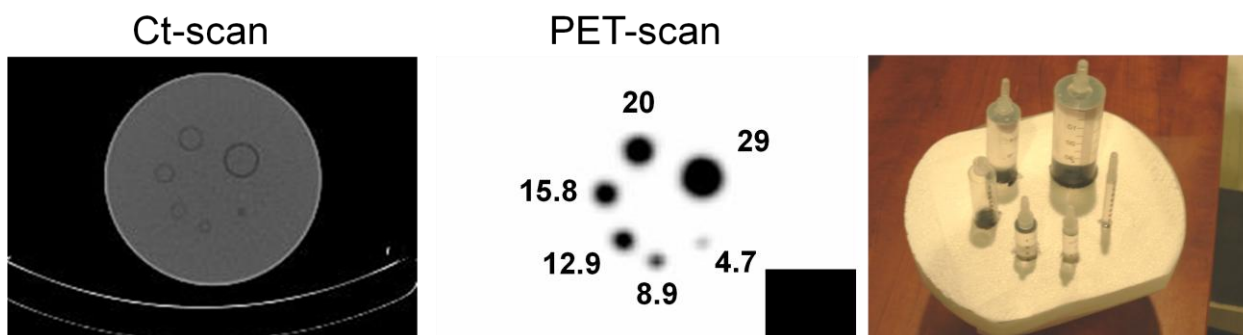
Several steps were taken to ensure proper image correction. For the reconstruction algorithm we used the default values employed for clinical analysis. Dead time and scatter corrections were embedded in the reconstruction algorithm. Dead time and scatter were presumably accurately corrected in the range of data where we applied the spill-in correction and partial volume recovery. The spill-in effect was due to the muscle radioactivity coming from the tracer administrated to the patient. In the same way for the static phantom we used radioactive water as reference. The spill-in factors were evaluated with the use of a phantom built from syringes of different diameters immersed in radioactive water. The water radioactivity concentrations matched those observed in patient studies and similar acquisition protocols to those used for the head and leg muscles were utilized. The same equation was used to achieve an accurate spill-in correction of the data with both the phantom and the patients.

3. An option may have been to consider different diameters in different parts of the vessel, as a means to obtain the relationship of the recovery co-efficient diameters in the human studies.

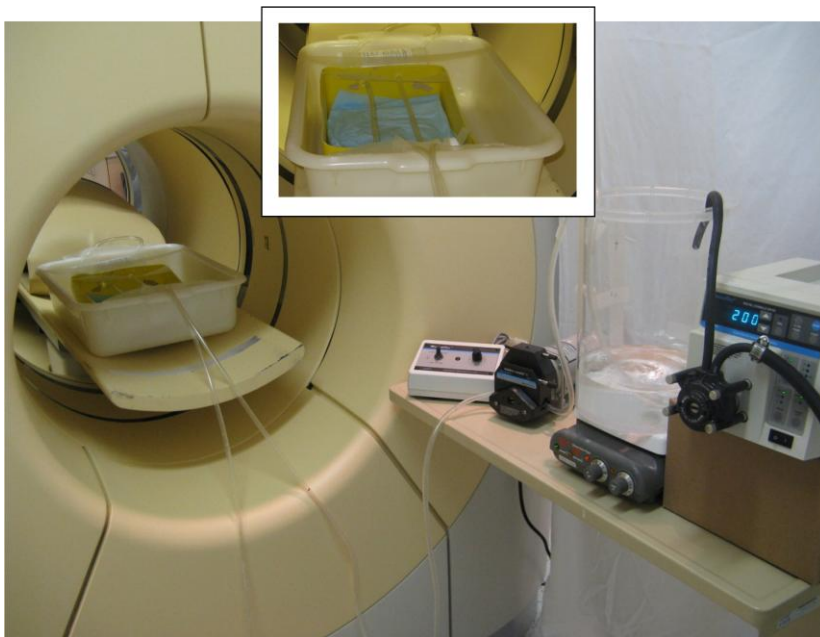
It would indeed have been interesting to obtain values for different vessels sizes. However the equipment we used and the experimental setting made this difficult. As we mentioned in the discussion, CT, MRI PET and post-mortem measurement vary in their assessment of blood vessel diameters. Furthermore, the field of view (18 cm) of the PET scanner we used for leg muscle and brain measurements was too small to accurately evaluate the relationship between different blood vessel sizes and there recovery coefficient. A solution would be to use acquisitions of the thoracic area where the aorta, carotid, brachial, subclavian arteries and the heart are in the same field of view. We agree that further investigation need to be done to establish a relationship for the recovery coefficient in-vivo.

4. It would have been useful to show examples of the phantom and patient images.

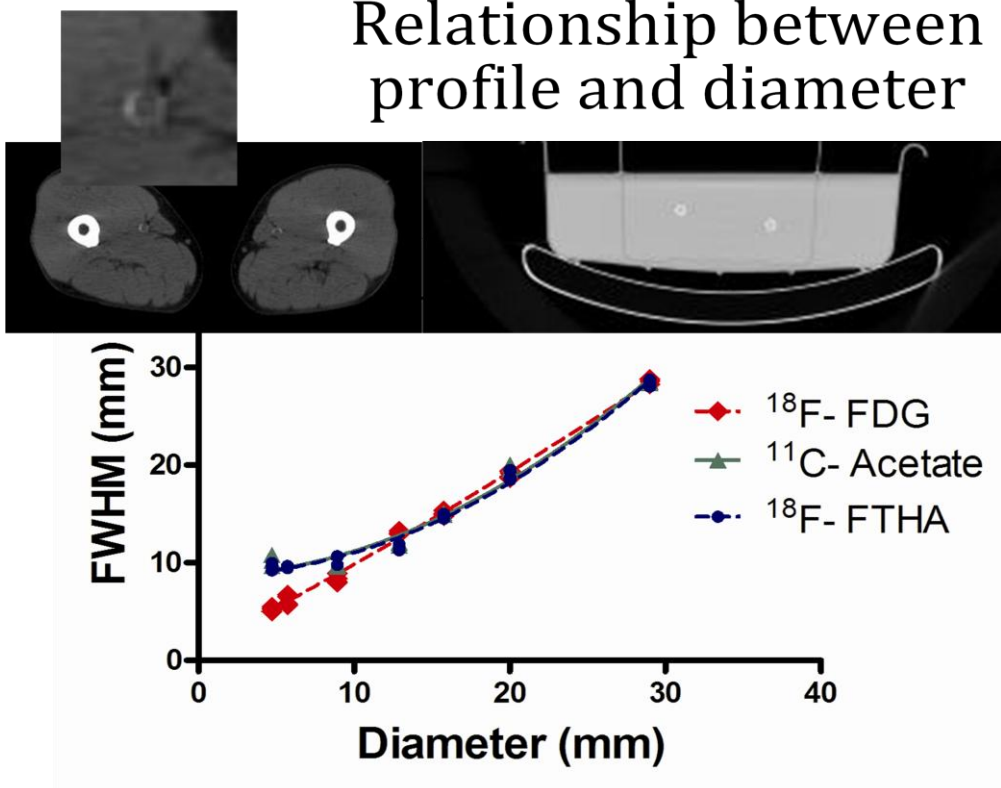
Static phantom



Dynamic phantom (water tank, peristaltic pump, tubing immersed in water)

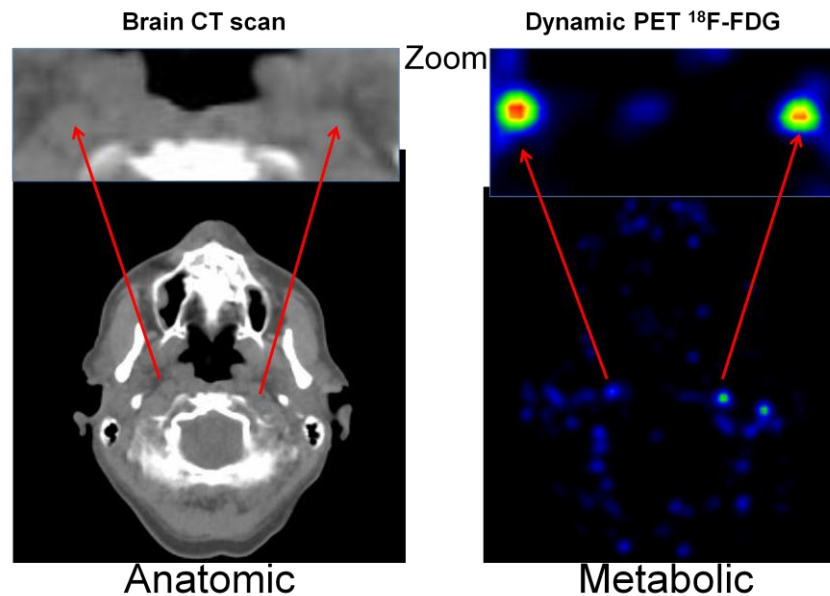
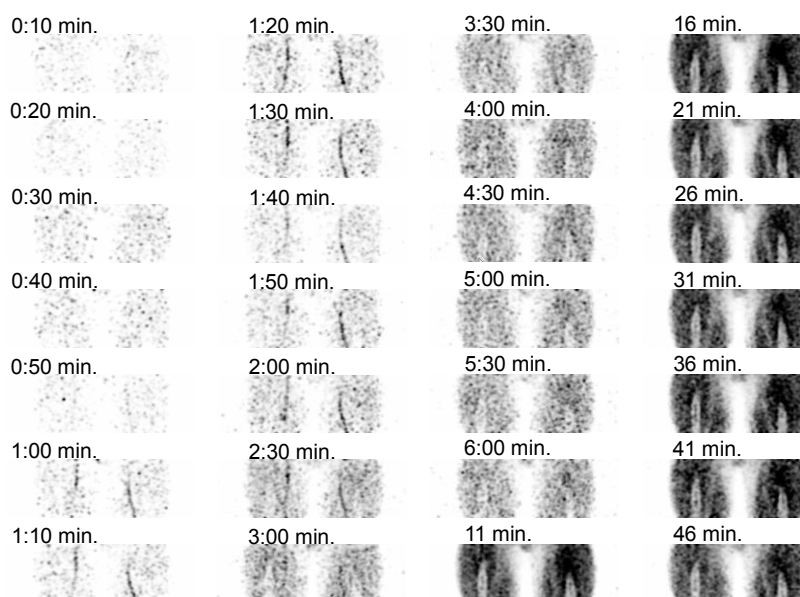


Relationship between profile and diameter



Brain PET acquisition

Image Derived Input Function (IDIF)

Leg muscle PET acquisition of ^{18}F -FTHA

F18-FTHA PET-CT mini GXL from Phillips dynamic acquisition (list-mode). LORreconstruction
 Sequence of 28 frames (10 frames * 10 s, 8 frames * 30 s and 8 frames * 5 min)

5. Experiments 2 and 3 deal with cardiac imaging. It is unclear why recovery co-efficient and spill-in correction data were not considered for the heart in human disease or animal models.

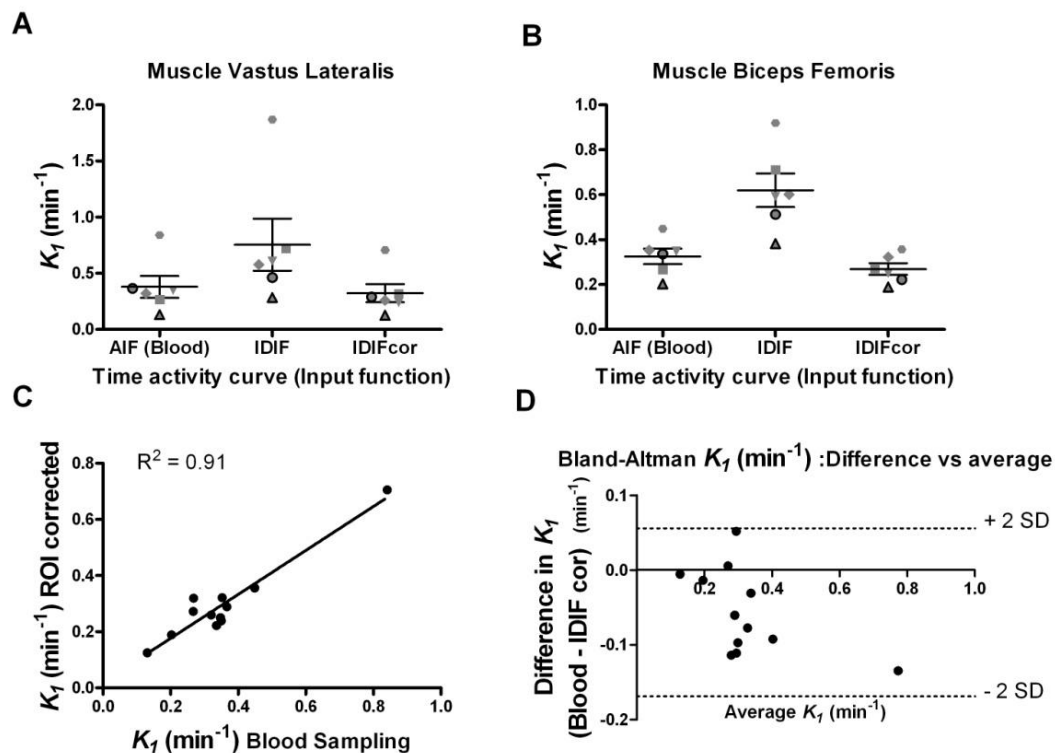
Although the whole body was imaged, experiment 1 was not aimed at imaging the heart, this project was conducted in our facility by Dr Carpentier and focused on the metabolism of brown fat measured with ^{11}C -acetate (Dr Carpentier, unpublished data). Under these conditions it was found that it may not be necessary to correct for partial volume. The spill-in effect from the myocardium on the input function is corrected by subtracting the difference between the heart and the blood radioactivity; this value is multiplied by a coefficient factor when the myocardial uptake is higher than in blood. Experiments 2 and 3 pertaining to the animal myocardial model used the recovery coefficient described previously.

6. As already noted, the potential applications of the results (or lack thereof) related to cardiac imaging should be alluded to in the discussion

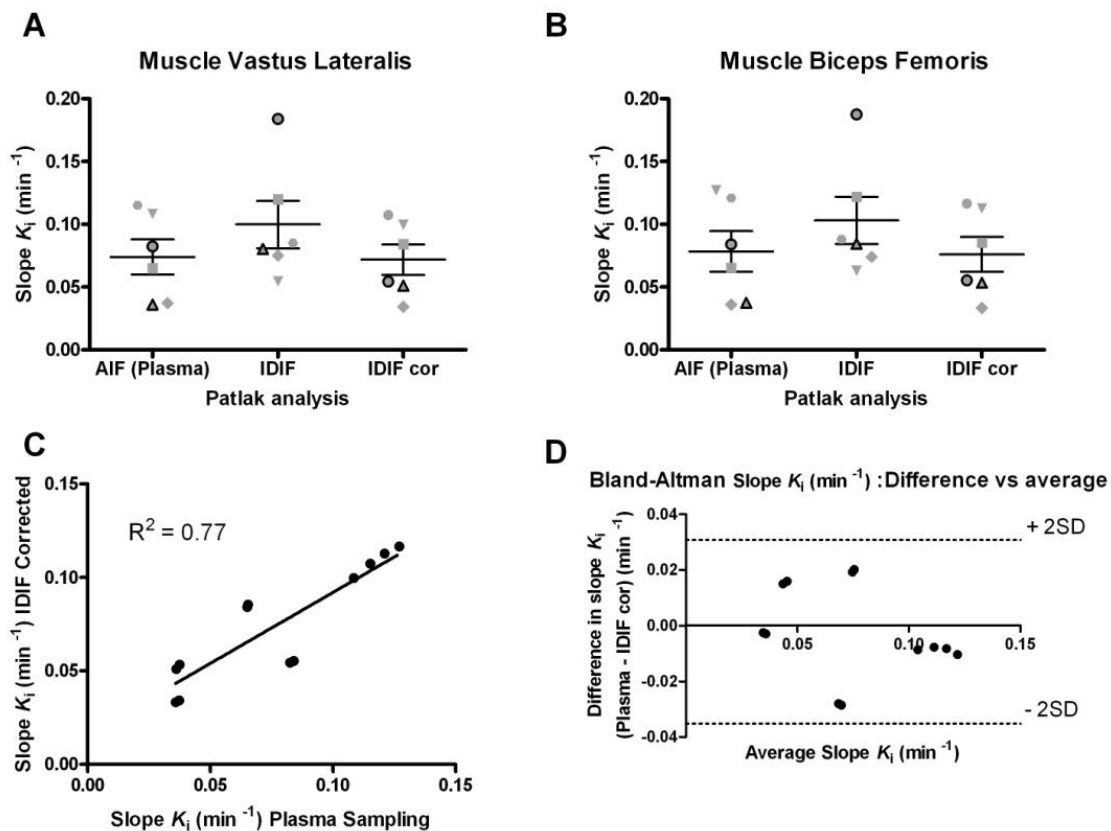
The following text should have been included in the article discussion (*2nd paragraph second sentence*): “Because of the difficulty in obtaining reliable data from arterial imaging, IDIF was for a long time restricted to the left ventricle, which offers a relatively large pool of arterial blood in myocardial imaging studies”. When performing heart imaging, a spill in correction is considered sufficient for most blood flow radiotracers (^{15}O - H_2O , ^{13}N -ammonia, ^{11}C -acetate, ^{82}Rb (*J Nucl Med* 2009;50:1062-1071)) as the partial volume has little impact on the results.

7. The candidate reports correlations, but also useful would be Bland-Altman plot displays.

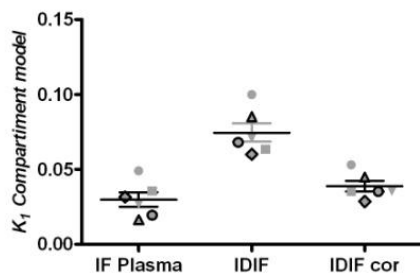
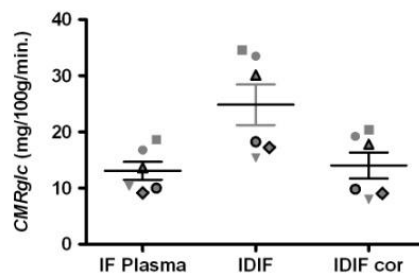
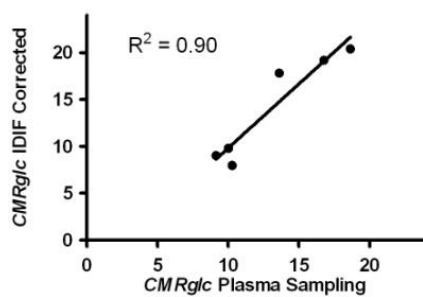
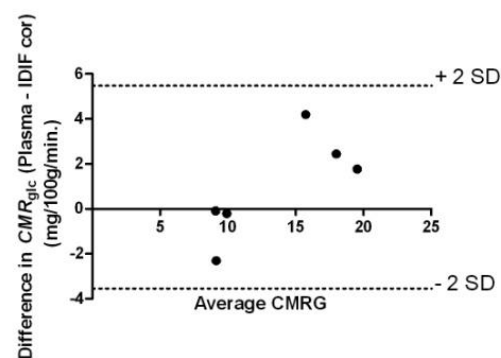
^{11}C -acetate:



The Bland-Altman graph shown a slight underestimation of the K_1 values when we use the IDIF corrected for partial volume. But, it should be kept in mind that this study has several inherent limitations, although all the data are within the 95% confidence interval. It was not possible to establish a true reference method (Gold standard) against which to compare our MBF values, and the leg muscle present some shortcoming when used with ^{11}C -acetate. Nonetheless a spill-over correction method should be designed to improve the result.

^{18}F -FTHA:

When compared to the blood sampling result we can see that correcting the IDIF for partial volume and spill-in improve estimation of the uptake (K_i) values. The correlation (C) is consistent with the Bland-Altman graph (D).

^{18}F -FDG:**A****B****C****D**Bland-Altman CMR_{glc} : Difference against average

Using IDIF values corrected for partial volume yield CMR_{glc} values closer to those obtained when using a blood sampling. Despite the small number of values, the trend in the correlation (C) is consistent with the result of the Bland-Altman graph (D).

Chapitre 3. Article (2)

¹¹C-Acetoacetate - a new PET tracer of myocardial function

Etienne Croteau, Sébastien Tremblay, Suzanne Gascon, Véronique Dumulon-Perreault, Sébastien M. Labbé, Jacques A. Rousseau, Stephen C. Cunnane, André C. Carpentier, François Bénard et Roger Lecomte.

(en attente pour) « Molecular Imaging Journal »

Ma contribution a été majeure (>85%) dans l'élaboration, la conception, l'expérimentation, l'analyse et la rédaction de ces travaux.

Chapitre 3.1. Résumé de l'article en français

Objectif : Cette étude évalue le potentiel du ^{11}C -acétoacétate, un corps cétonique, comme radiotracteur myocardique pour évaluer la fonction ventriculaire, l'indice de perfusion myocardique (MPI) et la consommation en oxygène du myocarde (MVO_2) par imagerie TEP.

Méthodes : Un premier groupe de validation de six rats Fischer mâles (239 ± 62 g) a été utilisé avec co-injection de ^{14}C -acétoacétate et de ^3H -acétate pour évaluer la fonction d'entrée artérielle, la captation au niveau du myocarde et de ses mitochondries, et pour établir une corrélation avec l'acquisition cardiaque dynamique TEP au ^{11}C -acétoacétate et au ^{11}C -acétate. De plus, les valeurs obtenues dans l'évaluation de la présence des métabolites ^{14}C - CO_2 et ^3H - H_2O ont permis la validation de l'utilisation du modèle cinétique à trois compartiments. Quinze séances d'imagerie dynamiques synchronisées TEP ont été menées chez des rats Fisher mâles (290 ± 38 g) en utilisant le ^{11}C -acétoacétate et le ^{11}C -acétate à intervalle de 48 heures.

Résultats : Dans ces conditions les valeurs de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) étaient similaires pour le ^{11}C -acétoacétate et le ^{11}C -acétate (test- t pairé $p = 0,38$). Le MPI et la MVO_2 ont été obtenues à partir d'un modèle à trois compartiments en utilisant la fonction d'entrée dérivée de l'image et le coeur. Le MPI et la MVO_2 obtenues avec le ^{11}C -acétoacétate sont corrélées au ^{11}C -acétate, mais avec un biais systématique statistiquement significatif inférieur pour le ^{11}C -acétoacétate ($36 \pm 13\%$ pour le MPI et $26 \pm 17\%$ pour la MVO_2 ; test- t pairé, $p < 0,05$).

Conclusion : Le ^{11}C -acétoacétate est un radiotracteur fiable pour l'évaluation simultanée de la perfusion du myocarde, la consommation en oxygène et la fonction cardiaque. La méthode d'imagerie TEP proposée est nouvelle et simple, elle ouvre la voie à une caractérisation plus approfondie du rôle des corps cétoniques dans la physiopathologie cardiaque.

Chapitre 3.2. Texte de l'article

¹¹C-Acetoacetate - A New PET Tracer of Cardiac Function and Metabolism

Etienne Croteau¹, Sébastien Tremblay¹, Suzanne Gascon¹, Véronique Dumulon-Perreault¹, Sébastien M. Labbé³, Jacques A. Rousseau¹, Stephen C. Cunnane^{2,3}, André C. Carpentier³, François Bénard⁴ and Roger Lecomte¹

Running title: Myocardial ¹¹C-acetoacetate imaging

¹ Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, and Sherbrooke Molecular Imaging Center, Centre de recherche clinique Étienne-LeBel, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke,

² Research Center on Aging,

³ Department of Medicine, Sherbrooke, QC, Canada

⁴ Division of Nuclear Medicine, Department of Radiology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Author for correspondence and reprints:

Dr. Roger Lecomte

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology

Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. (819) 820-6868 ext. 14608

Fax (819) 829-3238

E-mail: Roger.Lecomte@USherbrooke.ca

First author:

Etienne Croteau

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology

Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. (819) 346-1110 ext. 11868

Fax (819) 829-3238

E-mail: Etienne.Croteau@USherbrooke.ca

Word count: 4467

Abstract

^{11}C -acetoacetate was compared to ^{11}C -acetate to establish its potential as a PET tracer for cardiac imaging. List-mode gated cardiac PET scans were acquired using ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate in male Fisher rats, each animal being imaged twice within 48 h, once with ^{11}C -acetoacetate and once with ^{11}C -acetate. Under these conditions, ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate yielded comparable left ventricular ejection fraction (LVEF) (paired *t*-test, $p = 0.38$). The ^{11}C -acetate kinetic model was used to evaluate ^{11}C -acetoacetate kinetics. The blood input function, the metabolite production along with the heart and mitochondrial uptake of acetoacetate and acetate were investigated using co-injection of ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate, and used to validate a 3-compartment model aimed at evaluating the myocardial perfusion index (MPI) and the myocardial oxygen consumption (MVO_2). MPI values were compared to those obtained using a simplified 2-compartment models while the MVO_2 values were compared to those obtained by the standard analytical approach using (k_{mono}) as an index of the initial myocardial clearance rate. The results obtained by these different models yielded consistent results for MPI and MVO_2 for ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate. MPI and MVO_2 obtained using the 3-compartment model with ^{11}C -acetoacetate were well correlated with those measured with ^{11}C -acetate but lower by a factor of $36 \pm 13\%$ for the MPI and $26 \pm 17\%$ for the MVO_2 (paired *t*-test, $p < 0.05$). Kinetic analysis using the ^{11}C -acetate model showed that ^{11}C -acetoacetate is a valid tracer for simultaneous assessment of myocardial perfusion and metabolism and characterisation of the left ventricular heart function in the rat. The proposed PET imaging procedure is novel and simple, and opens the way to a more thorough characterization of the role of ^{11}C -acetoacetate in cardiac pathophysiology.

Key Words: Acetoacetate, Acetate, Left ventricular ejection fraction (LVEF), Myocardial perfusion index (MPI), Myocardial oxygen consumption (MVO₂).

Abbreviation list:

ECG: Electrocardiogram

FOV: Field of view

IDIF: Image-derived input function

LVEF: Left ventricular ejection fraction

MPI: Myocardial perfusion index

MLEM: Maximum likelihood expectation maximization

MVO₂: Myocardial oxygen consumption

ROI: Region of interest

TAC: Time activity curve

INTRODUCTION

^{11}C -Acetate is a well-known metabolic PET radiotracer (1, 2) that reliably measures myocardial perfusion index (MPI) and the myocardial oxygen consumption (MVO_2). Acetate is directly metabolized to acetyl-CoA by acetyl-CoA synthetase in mitochondria (3), by which it enters the Krebs cycle. Acetyl-CoA can return to the cytoplasm where it can also be incorporated into sterol and fatty acid synthesis by the action of the ATP-citrate lyase (Figure 1). During intense physical exercise, fasting, fever or infection, the heart's energy reserves may become depleted and myocytes shift beyond glucose and fatty acids to also burn the ketone bodies, acetoacetate and beta-hydroxybutyrate, which are produced through hepatic ketogenesis.

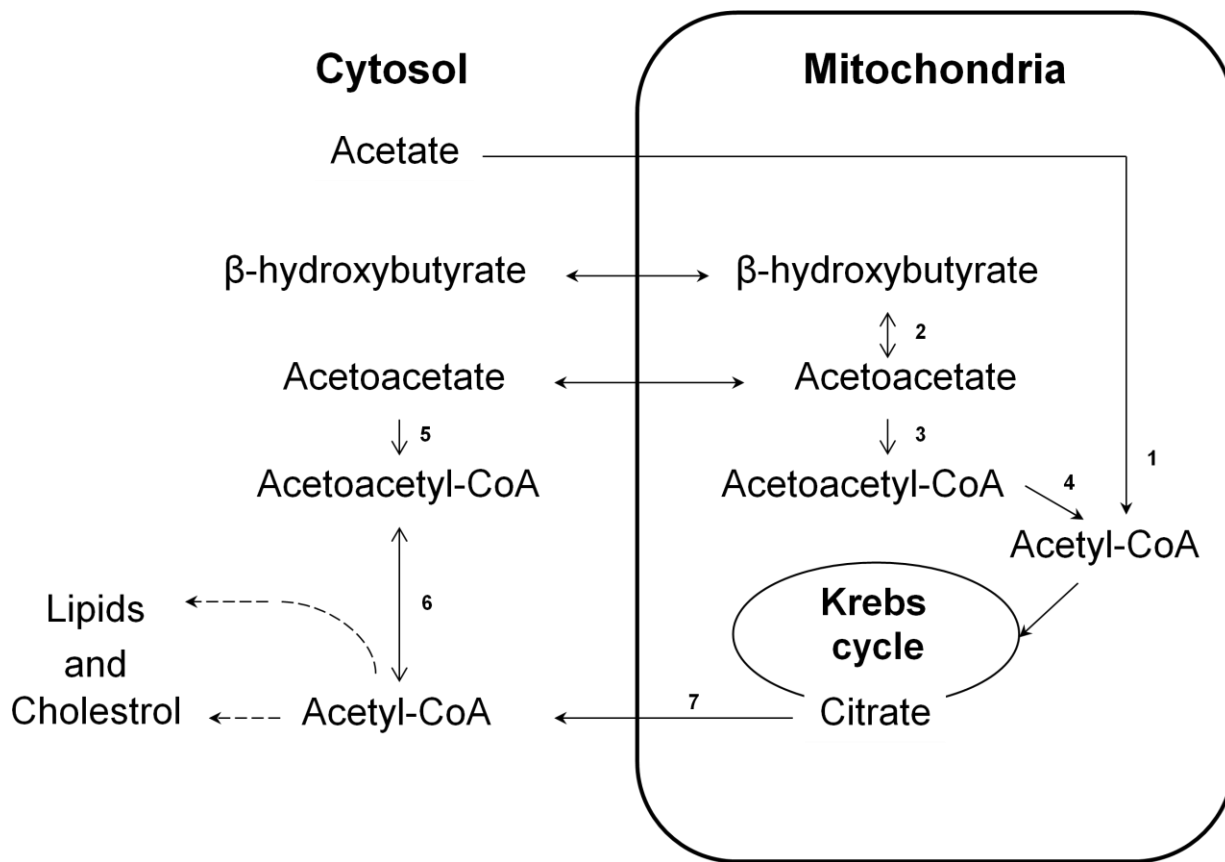


Figure 1 - Schematic representation of the metabolic pathways of acetate, beta-hydroxybutyrate and acetoacetate in the heart. Key to the enzymes involved: (1) acetyl-CoA synthetase; (2) Beta-hydroxybutyrate dehydrogenase; (3) succinyl-CoA 3-oxoacid CoA transferase; (4) acetoacetyl-CoA thiolase (mitochondrial); (5) acetoacetyl-CoA synthetase; (6) acetoacetyl-CoA thiolase (cytoplasmic); (7) ATP citrate lyase.

Acetate and acetoacetate share similar metabolic pathways, cross the myocardial membrane using the same monocarboxylic transporters (4), and are both substrates of the Krebs cycle. The mitochondrial oxidation of acetoacetate as an energy substrate first requires its conversion into acetoacetyl-CoA by succinyl-CoA-3-ketoacid transferase (5) and then into acetyl-CoA by acetoacetyl-CoA thiolase (3). Cytosolic acetoacetate can be incorporated into

lipogenesis pathway. This involves conversion of acetoacetate first to acetoacetyl-CoA by acetoacetyl-CoA synthetase and then to cytoplasmic acetyl-CoA by acetoacetyl-CoA thiolase, which enter the lipids and cholesterol synthetic pathway. Acetoacetate also has antioxidant properties (6, 7, 8) and in some models increased the contractility of the heart during ischemic episodes (9).

For the present study, our hypothesis was that since acetoacetate has a somewhat different metabolic fate than acetate, ^{11}C -acetoacetate (10) has the potential to provide heart function, MPI and MVO_2 , this characterization could lead to a unique window on myocardial mitochondrial integrity, antioxidant capabilities and beta-adrenergic inotropic effects, all of which could have implications in congestive heart failure or post-ischemic episodes.

To validate ^{11}C -acetotacetate as a new *in vivo* PET tracer, we used dynamic gated PET imaging to non-invasively obtain the left ventricular ejection fraction (LVEF) together with MPI and MVO_2 in a rat model. The latter two parameters were compared and validated against ^{11}C -acetate using kinetic analysis (1, 2). ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate were used to validate the blood input function and the presence of radiotracers in heart mitochondria in view of the PET experiments to be carried later on. The MPI values from a 3-compartment model (11, 12) were compared to those obtained with a simplified 2-compartment model (13) in which the input function was corrected for the presence of metabolites. For MVO_2 , the 3-compartment model was compared to a simple mono-exponential model not requiring a blood input function (1). Regardless of the model used, the MPI and MVO_2 obtained with ^{11}C -acetoacetate correlated well with values obtained with ^{11}C -acetate. We provide evidence here that ^{11}C -acetoacetate yield accurate MPI and MVO_2 when used as an *in vivo* PET tracer in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Animal experiments:

All experiments were performed according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and of our local institution's Ethics Committee for Animal Experiments. PET cardiac image acquisitions with ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate were conducted in 15 male Fisher rats (290 ± 38 g), with imaging sessions separated by 48 h. Animals were given free access to food and water before the experiments. The validation of the input function method with ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate was carried out in a group of six male Fisher rats (239 ± 62 g).

Radiotracers:

[1- ^{11}C]-Acetoacetate was synthesized by carboxylation of the lithium isopropenolate anion produced by the addition of isopropenyl acetate to methyllithium (14). [1- ^{11}C]-Acetate was synthesized by the Grignard reaction in which ^{11}C - CO_2 reacts with methyl magnesium chloride, with no carrier added (15). For injection, ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate were formulated in a citrate-NaCl buffer at a final pH 5.5. Using an excess of NaOH, [3- ^{14}C]-acetoacetate was obtained from the alkaline hydrolysis of ethyl ^{14}C -acetoacetate (1.9 GBq/mL; American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA), purified on an anion exchange resin chromatography column (AG1X8; 200-400 mesh, Biorad, Montreal, Canada), and eluted with citrate solution at pH 5.0 (16). The eluate was divided into 200 μL samples and the ^{14}C -acetoacetate fraction was collected and pooled. ^3H -Acetate at a concentration of 3.7 GBq/mL was obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada).

PET Imaging:

Rats were prepared for PET imaging under anesthesia with isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, Canada) delivered through a nose cone at a concentration of 1.5% at 1 L/min oxygen flow. A catheter was installed into the tail vein for the injection of ^{11}C -acetate or ^{11}C -acetoacetate. Blood β -hydroxybutyrate concentration was measured (PrecisionXtra, Abbott Laboratories) to exclude rats that had been fasting. Body temperature, respiration and heart rates were monitored for the entire duration of the experiment (SA Instruments Inc., New York, USA). The PET experiments were performed on a LabPET4 scanner (Gamma Medica) (17, 18), which has a transaxial and axial fields of view of 11 cm and 3.75 cm, respectively, and achieves a nearly isotropic resolution of 1.35 mm^3 . A 20.5 min dynamic list-mode data acquisition with cardiac gating was initiated, followed 30 s later by the administration of the radiotracer using an injection pump ($100 \pm 25 \text{ MBq}$ in $300 \mu\text{L}$ at $900 \mu\text{L}/\text{min}$), followed by a $100 \mu\text{L}$ saline flush. The same procedure was replicated in every imaging session. Image planes were reconstructed on a 160×160 matrix (voxel size of $0.5 \times 0.5 \times 1.175 \text{ mm}^3$) with 10 iterations using a maximum likelihood expectation maximization (MLEM) algorithm implementing analytical detector response functions in the system matrix (19). Cardiac left ventricular functional parameters were extracted from the ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate list-mode PET data in the interval from 60 to 240 s post-injection, using a sequence of eight electrocardiogram (ECG)-gated frames based on the R-R intervals. These gated heart image series were also reconstructed with 10 MLEM iterations and used for the analysis of the LVEF. The Corridor4DM software (Segami Oasis, Laval, Canada) was used to reorient and analyse the cardiac images, a procedure previously validated with a small rodent heart phantom (Figure 1) (20).

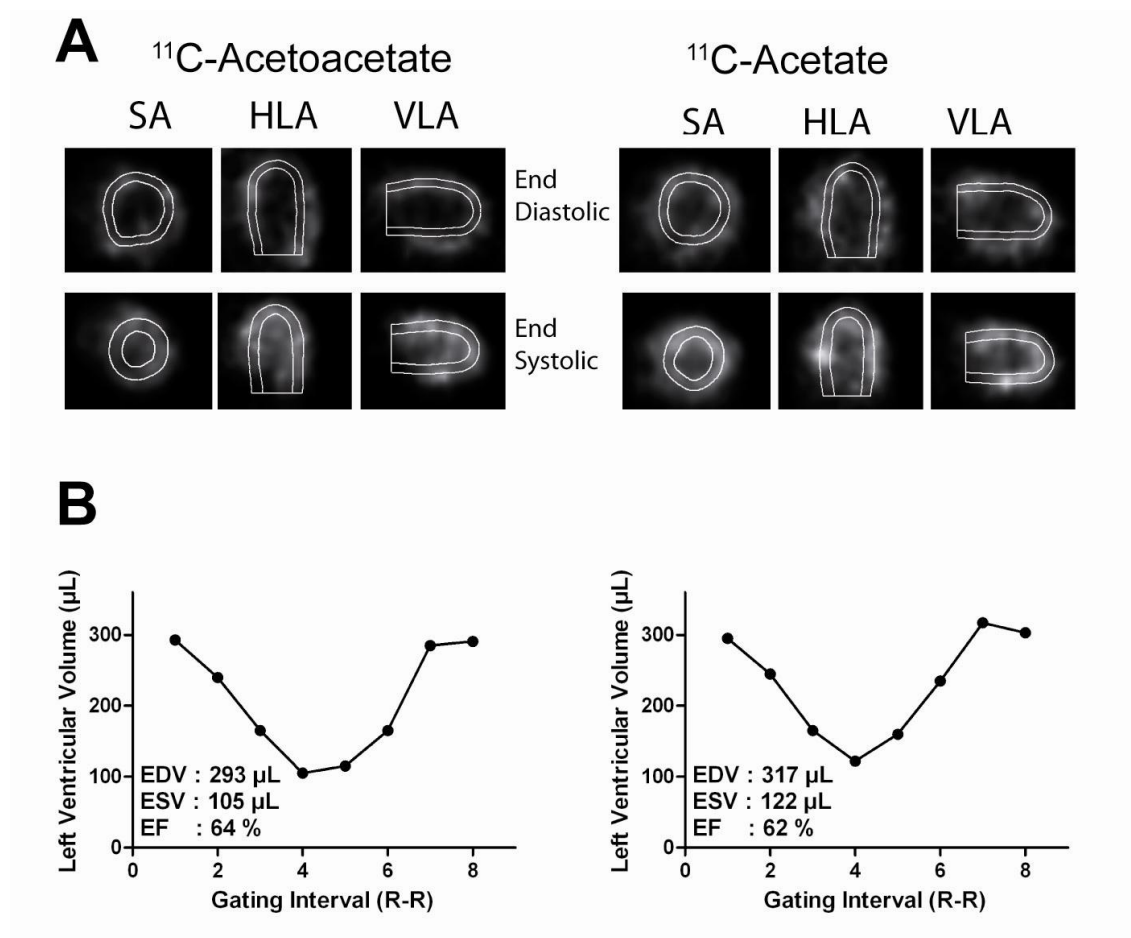


Figure 2- (A) Gated images obtained between 60 and 240 s after i.v. bolus injection of 103 MBq of ^{11}C - acetoacetate or 105 MBq of ^{11}C -acetate to a 220 g rat. End-diastolic and end-systolic; short axis (SA), horizontal long axis (HLA) and vertical long axis (VLA). (B) Left ventricular volume as a function of 8 gating interval from which the end-diastolic volume (EDV), end-systolic volume (ESV) and ejection fraction (LVEF) can be extracted.

^{14}C -acetoacetate, ^3H -acetate experiment :

A mixture of ^{14}C -acetoacetate (0.1 μmol) and ^3H -acetate (0.3 μmol) was injected within 1 min in the tail vein of each rat. Blood samples (75 μL) were collected manually from the femoral artery at 20, 40, 60, 90, 120, 150, 300, 600, 900 and 1200 s post-injection. At the end of

the experiment, the animals were exsanguinated and the heart removed, washed with 0.9% NaCl, and kept on ice for further processing.

Plasma samples were divided into two fractions; one vial was counted immediately to obtain the ^{14}C and ^3H in the blood while the remaining plasma was dried by speed vacuum and used for metabolite analysis. Before drying the samples, they were brought to a pH of 5.0 to promote the decomposition of acetate ($pK_a = 4.76$) and acetoacetate ($pK_a = 3.77$) to the corresponding salts, water ($^3\text{H-H}_2\text{O}$) and carbon dioxide ($^{14}\text{C-CO}_2$). Our analysis was restricted to water and carbon dioxide since they are the major byproducts of acetate and acetoacetate decomposition. For each time point, the percentage of initial radioactivity in the blood was obtained by multiplying the blood specific activity by the whole blood volume computed as follows (21):

$$\text{Blood volume (mL)} = 0.06 \times \text{body weight (g)} + 0.77 \quad \text{Eq 1}$$

assuming a hematocrit of 42.7% (21). The injected radioactivity was measured by counting a known volume of the radiotracer solution to be injected. The TAC of ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate were calculated from the dried samples and the metabolite fractions were evaluated from the ratio between the plasma and the dry sample for each time point.

Procedure to evaluate uptake of heart mitochondria:

Heart tissue samples were homogenized (PowerGen 125, Fisher Scientific) in Chappell-Perry buffer solution at 4° C and pH 7.4 (10 mM KCL, 50 mM MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1 mM ATP pH 7.4). Homogenates were centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min at 4°C, and the supernatant collected and centrifuged again at $12,000 \times g$ for 10 min at 4°C.

Following the second centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 mL Chappell-Perry buffer solution at pH 7.4. A sample of myocardial tissue and a 50 μ L aliquot of the mitochondrial sample were kept frozen at -80°C for quantification of glutamate dehydrogenase (GDH) activity in order to correct for the fractional recovery of mitochondria extracts from the heart tissues (22). To evaluate the radiotracer content of the isolated mitochondria, the activity of GDH, an enzyme specifically present in the mitochondria, was evaluated in both samples and then corrected. The amount of radioactivity in the heart and the mitochondria (extracted as described above) at 20 min post-injection was obtained from the specific activity of the heart tissue and that of the mitochondrial fraction corrected for the GDH enzymatic activity, divided by the injected dose. ^3H and ^{14}C activity of plasma, heart and mitochondria was measured in a beta-counter (LKB Wallac, Norwalk, USA) using a dual window protocol (1-6 keV for ^3H and 8-170 keV for ^{14}C). Data were corrected for cross contamination (20% for the ^{14}C in the ^3H window and 0.8% for the ^3H in the ^{14}C window).

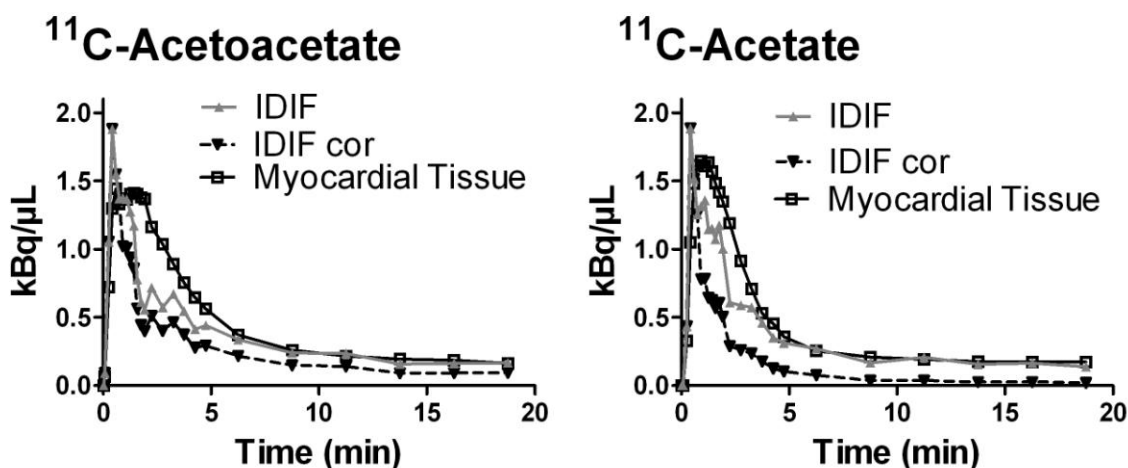


Figure 3 – ^{11}C -acetoacetate (103 MBq) or ^{11}C -acetate (105 MBq) tissue and blood TACs from a 20 min list-mode PET acquisition of a Fisher male rat (220 g). IDIF corrected for metabolites (IDIF cor).

Pharmacokinetic analysis:

A dynamic series of 24 frames was sorted out from the list-mode data using the following sequence: 1×30 s, 12×10 s, 6×30 s, 6×150 s. Tissue time-activity curves (TACs) were generated from a region of interest (ROI) drawn manually on the myocardium in the summed frames of the interval from 1 to 3 min post-injection. The blood input function was obtained from a ROI drawn on the left ventricular cavity and corrected using a phantom made of several hot or cold spheres of different diameters (23). The internal diameter of the left ventricle was used to obtain the spillover and partial volume recovery coefficient. Spillover correction was effected by multiplying the difference between heart and blood radioactivity, times the spillover correction factor. To assess the importance of correcting for the partial volume effect, the maximum intensity of the image-derived input function was compared to that of a blood sample. In the rat where the dimension of the left ventricular cavity has a radius of 2.6 ± 0.6 mm (24) the observed partial volume effect is less than 5% making it unnecessary to make a correction.

Both PET tracers were analyzed using the 3-compartment kinetic model developed for ^{11}C -acetate to obtain MPI and MVO_2 according to the following equations (2 and 3) (11, 12):

$$C_t(t) = [A_1 \cdot \exp(-(k_2 + k_3) \cdot t) + A_2 \cdot \exp(-k_4 \cdot t)] \otimes C_p(t) + \text{TBV} \cdot C_{\text{tot}}(t) \quad \text{Eq 2}$$

$$\text{where } A_1 = K_1 k_2 / (k_2 + k_3) \quad A_2 = K_1 k_3 / (k_2 + k_3)$$

and

$$C_p(t) = [1 - a_\theta \cdot (1 - \exp(-t \cdot \log 2 / m))]. C_{\text{tot}}(t) \quad \text{Eq 3}$$

C_t , C_p and C_{tot} are the tissue, plasma and total arterial TACs. K_1 to k_4 are the rate constants, TBV is the tissue blood volume and a_0 and m are parameters representing the $^{11}\text{C-CO}_2$ in blood. The values of each of these parameters were obtained by fitting the PET data to the model. The contribution of the radioactivity due to metabolites in the plasma was estimated using equation 3. The symbol \otimes indicates a convolution operation. K_1 represents MPI and k_2 represents MVO_2 .

Two alternative methods to derive MPI and MVO_2 values were also explored. First, for MPI, the results from the 3-compartment model were compared with those from a 2-compartment model (25) using an input blood function corrected for the metabolite fraction (MF). This model used an exponential fit and was previously validated with ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate data equation (4 and 5) (11):

$$C_t(t) = [K_1 \cdot \exp(-k_2 t)] \otimes C_p(t) \cdot [1 - MF(t)] \quad \text{Eq 4}$$

$$MF(t) = (Y_0 - \text{Plateau}) \times e^{(k \times t)} + \text{Plateau} \quad \text{Eq 5}$$

C_t and C_p are the tissue and plasma TACs, K_1 represents MPI. Y_0 is the initial metabolite fraction, the *Plateau* corresponds to the upper limit of the blood metabolite ratio for the radiotracer and k is a rate constant describing the conversion rate of the radiotracer to metabolites in the blood.

Next, the MVO_2 values obtained with the 3-compartment kinetic analysis were compared to those derived from a simple exponential fit of the initial portion of the rapid clearance phase of the myocardial TAC, (90 to 300 sec) post-injection of the radiotracer. Armbrrecht et al. observed a linear correlation in dog studies between the single exponential (K_{mono} index) and MVO_2 when using ^{11}C -acetate (26):

$$C_t(t) = C_{t=\theta} \cdot \exp(-k_{mono} \cdot t) \quad \text{Eq 6}$$

In the previous equation, $C_{t=0}$ is the maximum tissue activity defined at time zero, the rate constant k_{mono} represents the MVO_2 index. This method avoids the need for a blood input function, since it only take into account the clearance portion of the myocardial tissue TAC (27, 28).

Statistical analysis:

Statistical analyses were performed using PRISM 5.0 software package (GraphPad Software, La Jolla, USA). Data obtained from the co-injection of ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate were compared using a two-tailed paired Student's *t*-test. Similarly, the difference in myocardial function parameters between ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate were compared using a two-tailed paired Student's *t*-test. MPI and MVO_2 values obtained from ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate were compared using a two-tailed paired Student's *t*-test. The data from these two tracers were correlated against one another and also against the values obtained from kinetic modeling. A probability value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Overall, respiratory rate and heart rate were not significantly different from one acquisition or experiment to the next. The blood level of β -hydroxybutyrate measured before the experiment was always within the normal range (below 0.4 mmol/L).

Left ventricular function:

An example of the ECG gated-images and cardiac function parameters obtained with ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate in the same rat is displayed in Figure 1. On the average, both ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate yielded identical left ventricular function parameters, *i.e.* no significant difference in diastolic volumes (283 ± 28 versus 293 ± 42 μL), systolic volumes (128 ± 15 versus 126 ± 20 μL) or LVEF (55 ± 5 versus 56 ± 6 %) (paired *t*-test $p > 0.05$; Figure 3).

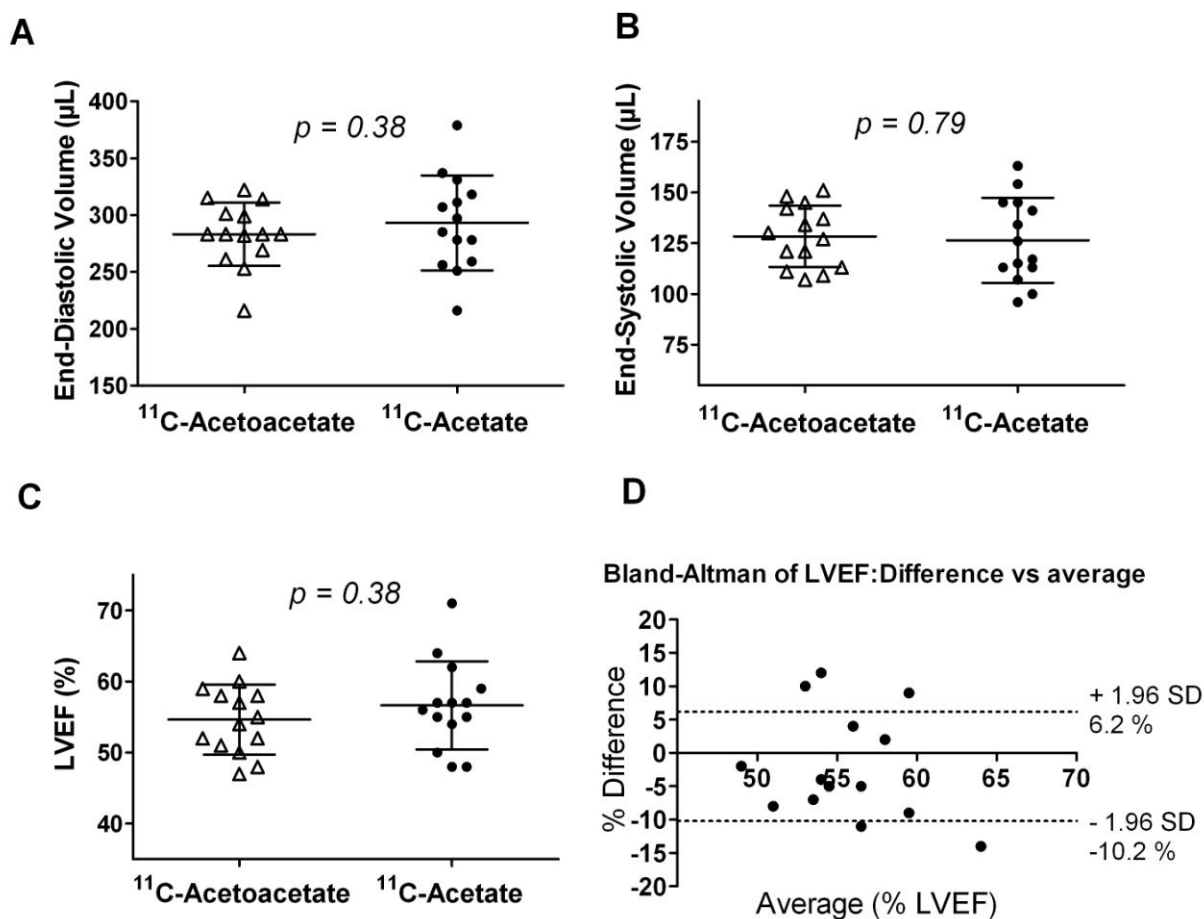


Figure 4 - Scatter plot with mean \pm SD of diastolic volume (A), systolic volume (B) and left ventricle ejection fraction (LVEF) (C) and Bland-Altman plot (D) of ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate. The p values are from a paired two-tailed Student t -test.

Input function and metabolites fractions:

The MPI and MVO_2 values were obtained from a 3-compartment model developed for ^{11}C -acetate. In order to validate the results obtained with this approach, the MPI and the MVO_2 were also calculated using a 2-compartment model for MPI and an exponential fit for MVO_2 . By validating our model first with ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate we were able to evaluate their

respective metabolite patterns and to generate blood input functions corrected for the presence of metabolites, which were then used for the 2-compartment model. These experiments permitted correlation of the MVO_2 data with those in the literature assessing the radiotracers uptake into the mitochondria (29).

The metabolic fates of ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate were significantly different (Table 1 and Figure 4). At 20 min post-injection, the uptake of ^{14}C -acetoacetate by the heart was almost a factor of 2 lower than that of ^3H -acetate ($p = 0.004$), even though their uptake in the myocardial mitochondria was not significantly different ($p = 0.31$). The measurable metabolites ($^3\text{H}_2\text{O}$; $^{14}\text{CO}_2$) in the blood were 47 ± 12 % lower for ^{14}C -acetoacetate than for ^3H -acetate. At euthanasia of the animal, 20 min post-injection, i.e. within the time window of the PET experiments, about twice as much ^{14}C -acetoacetate as ^3H -acetate was still present in its original form in the blood.

Table 1

Biodistribution of ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate in the blood, heart and myocardial mitochondria, at 20 minutes post injection.

Group / Tissue (N=6)	^{14}C -acetoacetate % injected dose	^3H -acetate % injected dose	<i>p</i> value
Heart	0.24% \pm 0.05%	0.44% \pm 0.10%	0.004
Myocardial mitochondria*	0.19% \pm 0.09%	0.17% \pm 0.07%	0.312
Total blood radioactivity	2.4% \pm 1.4%	3.9% \pm 0.7%	0.036
Blood native radiotracer	1.3% \pm 0.8%	0.6% \pm 0.2%	0.020
Metabolites fraction [†]	45% \pm 11%	85% \pm 5%	0.0001

* The myocardial mitochondria radioactivity was determined with the GDH correction.

[†] Measured as $^{14}\text{CO}_2$ for acetoacetate and $^3\text{H}_2\text{O}$ for acetate.

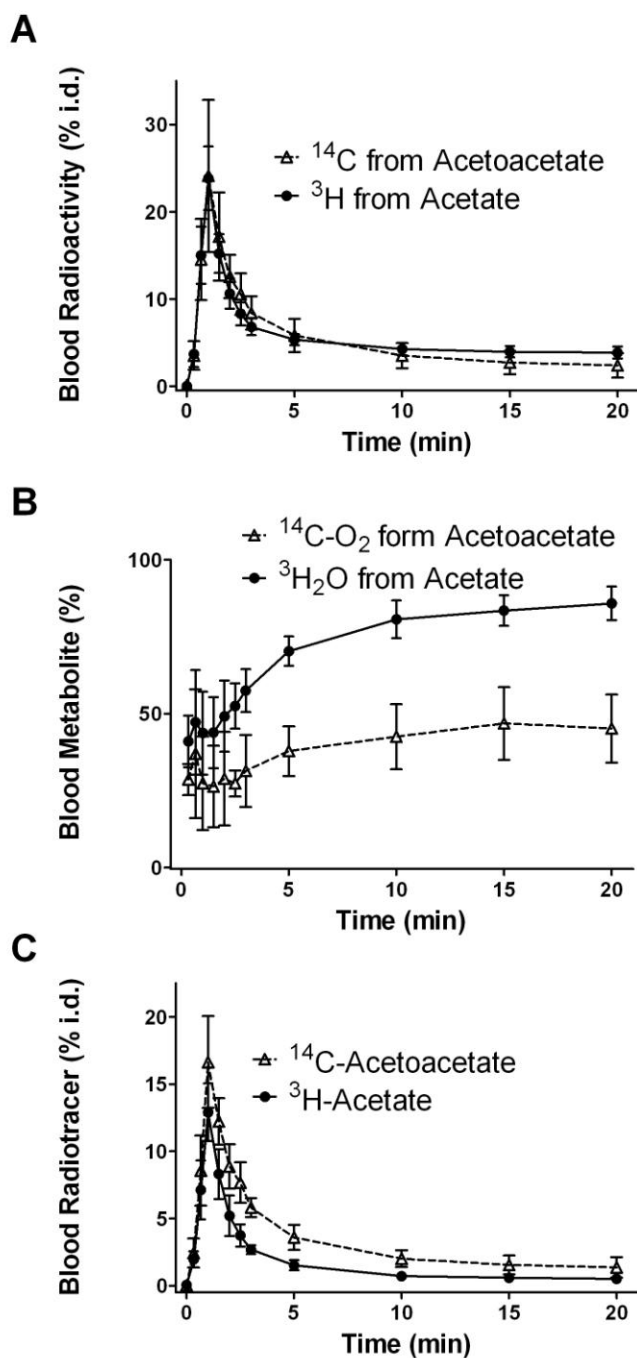


Figure 5 - Results following the administration of ^{14}C -acetoacetate (triangle) and ^3H -acetate (square): (A) blood radioactivity data as a % of the total injected dose (% i.d.); (B) percentage of metabolites in the blood; and (C) % injected dose of ^{14}C -acetoacetate (triangle) and ^3H -acetate (square) in blood after correction for the presence of metabolites. Data are mean \pm SD.

Myocardial perfusion index (MPI; K_1):

MPI values derived from kinetic analyses of ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate are presented in Figure 5. With both tracers, MPI was correctly estimated whether obtained from the 3- or 2-compartment models (Eq 2-3 or 4-5), as confirmed by the high values of the Pearson correlation coefficients (Figures 5A). MPI obtained with ^{11}C -acetoacetate and the 3-compartment model was well correlated but lower by a factor of $36 \pm 13\%$ than that measured with ^{11}C -acetate (paired t -test, $p < 0.05$). Within each kinetic model, there was also a significant positive correlation between the MPI obtained with ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate (Figures 5C & 6D).

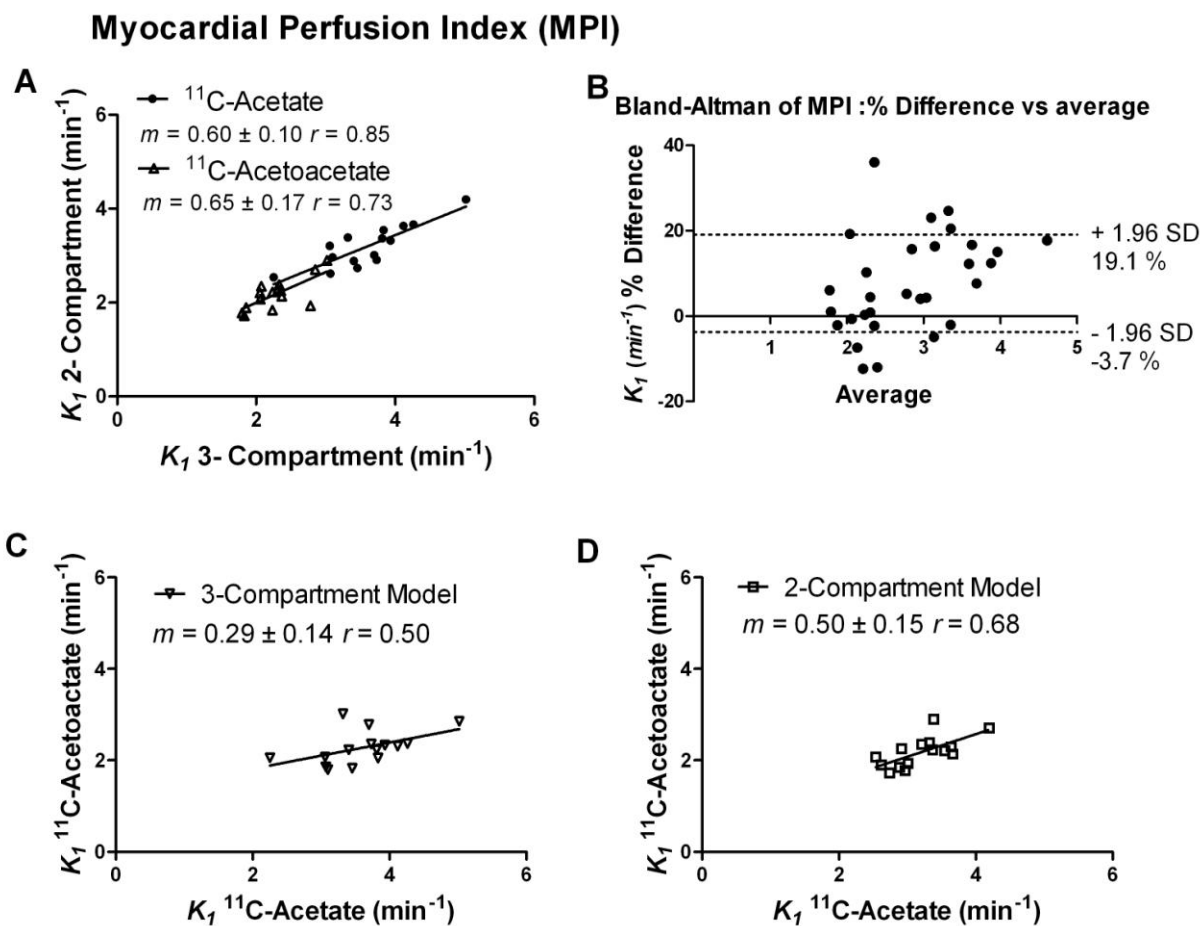


Figure 6 – (A) Correlation of myocardial perfusion index (MPI; K_1) values derived from the 3- and 2-compartment kinetic models for ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate and (B) Bland and Altman plot. The 2-compartment model used IDIF data corrected for the presence of metabolites from the ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate experiment were the 3-compartment was fit in the kinetic model. (C & D) MPI values obtained with ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate plotted for the 3- and 2-compartment kinetic models. Data show the slope (m) \pm SD and Pearson correlation coefficient (r).

Once the ^3H -acetate or ^{14}C -acetoacetate data had been corrected for loss of tracer to metabolites, MPI obtained with the 3-compartment model was comparable to that obtained with the 2-compartment model, although data in the 3-compartment model had more dispersion. Overall, both the 3- and 2-compartment kinetic models yielded similar MPI values, with average K_1 values of $3.6 \pm 0.6 \text{ min}^{-1}$ and $3.2 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$, respectively, for ^{11}C -acetate, and $2.3 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$ and $2.2 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$, respectively, for ^{11}C -acetoacetate. In each model, the MPI values obtained for ^{11}C -

acetotacetate using the acetate kinetic model were consistently and significantly lower than those obtained with ^{11}C -acetate ($p < 0.05$).

Myocardial oxygen consumption (MVO_2 ; k_2 or k_{mono}):

MVO_2 values obtained with the 3-compartment model (k_2) (Eq 2 & 3) were compared to those obtained from a mono-exponential fit (k_{mono}) applied to the initial part of the heart radioactivity clearance curve (Eq 6). MVO_2 estimations from the 3-compartment model and the mono-exponential approach yield similar values for both ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate (Figure 7A & B). MVO_2 values obtained with ^{11}C -acetoacetate using the 3-compartment model were well correlated but lower by a factor of $26 \pm 17\%$ than those measured with ^{11}C -acetate (paired t -test, $p < 0.05$). The k_2 and k_{mono} of ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate were comparable, irrespective of the kinetic model used (Figures 7C & 7D). MVO_2 values obtained for ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate were respectively $1.3 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ and $0.9 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ for the 3-compartment model, and $0.37 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$ and $0.27 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ for the mono-exponential fit. Although these two methods yielded different absolute values of MVO_2 , the ^{11}C -acetoacetate to ^{11}C -acetate ratio is similar, i.e. $70 \pm 16\%$ for the 3-compartment model and $74 \pm 12\%$ for the mono-exponential model ($p < 0.05$).

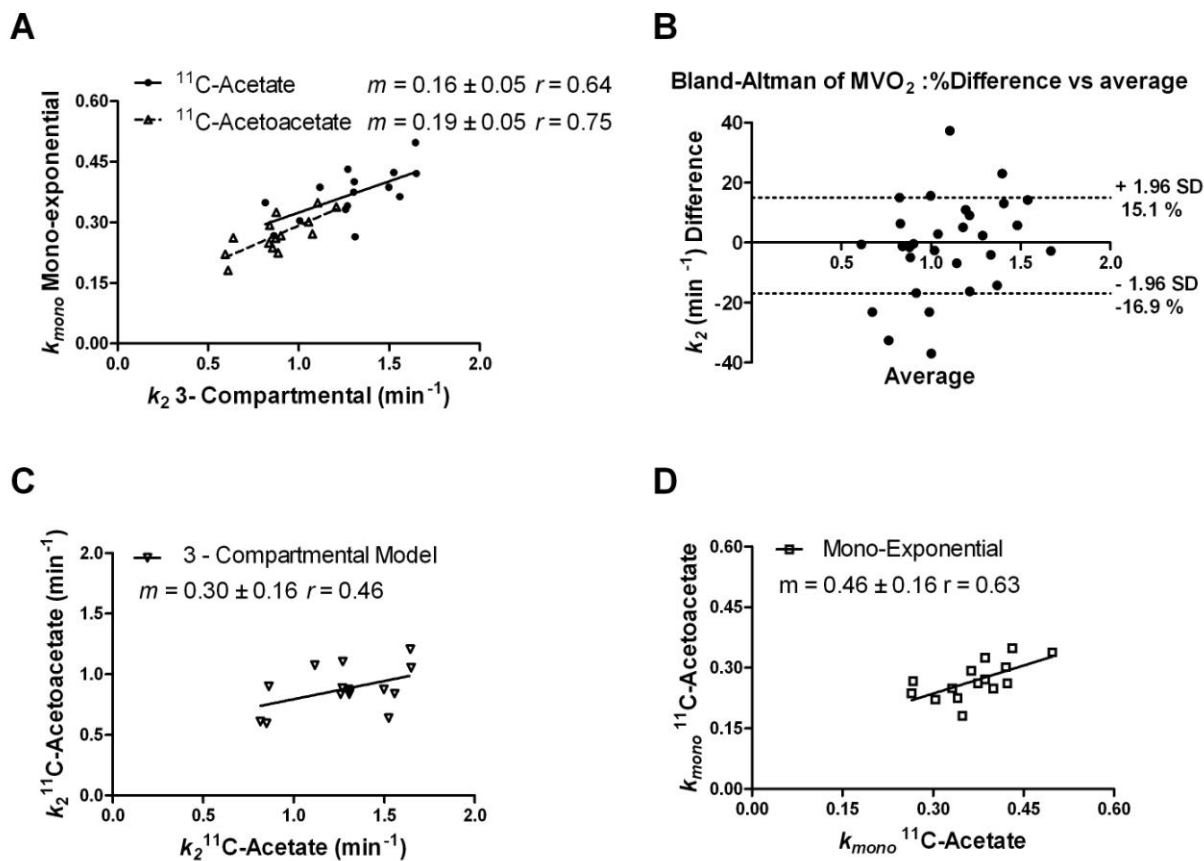


Figure 7 - (A) Regression analysis of myocardial oxygen consumption values from a mono-exponential fit against those obtained from a 3-compartmental kinetic model for ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate and (B) Bland and Altman plot. Correlation of MVO_2 values measured with ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate using (C) the 3-compartment model and (D) the mono-exponential fit. Slopes (m) \pm SD and Pearson correlation coefficients (r) are reported.

DISCUSSION

Although the cardiac uptake of ^{11}C -acetoacetate had been briefly reported (30), to our knowledge, this is the first systematic analysis of the myocardial metabolism of ^{11}C -acetoacetate using PET. Since acetoacetate partially shares the same metabolic pathways as acetate in the heart, its comparison to ^{11}C -acetate provides useful insight for the validation of ^{11}C -acetoacetate as a radiotracer of myocardial metabolism. This study also offered the opportunity to assess whether ventricular function can be as reliably assessed in rats using ^{11}C -acetoacetate as it was using ^{11}C -acetate with dynamic gated PET data acquisition (30-31). ^{11}C -Acetate is a well-established PET tracer which has been validated against direct measurements of myocardial perfusion with microspheres (11), as well as against two common PET radiotracers of myocardial perfusion, $^{13}\text{NH}_3$ (32) and ^{15}O -water (33). ^{11}C -Acetate is also a very suitable reference tracer to assess ^{11}C -acetoacetate because its myocardial kinetic are well understood and the extracted MVO_2 index has been fully validated (11, 26, 34, 35). Our main observation here is that the two radiotracers yield similar MPI and MVO_2 values in dynamic PET studies *in vivo* in rats. However, because acetoacetate has a somewhat different metabolic fate than acetate, ^{11}C -acetoacetate might be able to provide additional information on the metabolic integrity of the myocardial energy production chain that is not necessarily available in a PET study with ^{11}C -acetate (6, 9, 36).

Kinetic modeling with ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate was necessary to correctly interpret the PET data. These data was used to estimate the amount of ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate present in the heart and in myocardial mitochondria and allowed us to correlate PET data with blood radioactivity level and loss of the original radiotracers to metabolism. Compared

to other models such as the isolated perfused heart (29, 37, 38, 39, 40), *in vivo* PET metabolic imaging allows for the analysis of myocardial functional parameters under realistic physiological conditions and with the possibility of follow-up in the same animal. Taegtmeier et al. in a perfused heart experiment observed similar oxygen consumption rate for acetoacetate and acetate (29). This similarity in MVO_2 values was also observed in our experiment indicating that ^{14}C -acetoacetate and 3H -acetate myocardial mitochondria uptake was comparable. This tendency is also observed in the kinetic analysis of ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate. Despite the fact that the acetate kinetic model underestimates acetoacetate MVO_2 values, the difference between acetate and acetoacetate kinetics is consistent within each animal. Even though there was a higher concentration of 3H -acetate than ^{14}C -acetoacetate in the intact heart, their concentrations were similar in isolated myocardial mitochondria. The higher concentration of 3H -acetate in the heart may be due to the presence of metabolites which may be used mainly as an energy substrate (36). In the healthy state, acetoacetate is oxidatively metabolized at a rate similar to that of acetate (29, 41). The supplementary step involved in the processing of acetoacetate by degradative thiolases is presumably the limiting step for acetoacetate (29).

Furthermore, the understanding of the catabolism acetate an acetoacetate was improved with the results of the 3H -acetate and ^{14}C -acetoacetate experiment and helpful to correct the PET data for the presence of ^{11}C metabolites in the blood. The 3H -acetate and ^{14}C -acetoacetate TACs were used to correct the compartmental model for the presence of metabolites. The MPI index (K_1), was evaluated using two different kinetic models, a 3-compartment model where the metabolite contribution are estimated by the model and a 2-compartment model where the imaged-derived input function was already corrected for the presence of metabolites using an equation derived from the data obtained with the 3H -acetate et ^{14}C -acetoacetate experiments.

^{11}C -acetoacetate MPI values derived from the kinetic analysis of ^{11}C -acetate model, are lower than those obtained with ^{11}C -acetate. Further studies with $^{13}\text{NH}_3$ or another perfusion tracer will be needed to establish the correction factor to be applied to get correct MPI values with ^{11}C -acetoacetate. With ^{11}C -acetate, MPI is usually obtained from the product of K_1 and a coefficient related to the extraction fraction (13, 32, 42). In the present study ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate were compared at rest, when the MPI is normally low and displays minimal variability. Under these conditions, the metabolic behavior of the two radiotracers was similar and independent of the analysis method used. Using 10 s time frames, it was possible to confirm that the maximum uptake of ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate coincided in time (paired t -test, $p = 0.72$) and in maximum value (paired t -test, $p = 0.20$). The extraction fraction might have an impact on the product term used for the calculation of the MPI, suggesting a possible correction by a constant to obtain the MPI values.

The kinetic models for ^{11}C -acetate used here were previously validated to provide reliable oxygen consumption index over a wide range of myocardial workloads in humans (26) and in rats (30,31). A direct and significant correlation was obtained for the difference in oxygen concentration between the coronary sinus and the aortic blood (36) and of an indirect correlation of the data with the rate pressure product (systolic pressure \times heart rate) (43). However, even with different metabolic fate, the ^{11}C -acetoacetate kinetic model should mimic the result obtained by the MVO_2 ^{11}C -acetate and needs further investigation.

As a ketone body, acetoacetate may have cardioprotective properties against oxidative stress resulting from myocardial ischemia, by acting as an antioxidant and by improving myocardial contractibility (6, 8). Acetoacetate may also be able to restore the

glutathione/glutathione disulfide ratio, a known antioxidant factor, and can increase the myocardial beta-adrenergic inotropic effect (9).

^{11}C -acetoacetate is a promising new PET myocardial radiotracer that may have an important role in assessing heart function, MPI, MVO_2 and ketone metabolism in a single short dynamic-gated imaging session. Investigating ketogenic metabolic pathways in heart ischemia and cardiomyopathy may open new diagnostic opportunities. For instance, MVO_2 evaluated with ^{11}C -acetoacetate as an index of oxidative phosphorylation could potentially also provide information about myocardial mitochondrial membrane integrity (8, 9).

CONCLUSION

The aim of the study was to investigate the feasibility of using the ketone body - ^{11}C -acetoacetate - as a radiotracer for PET imaging of heart function. The metabolic properties of ^{11}C -acetoacetate were therefore compared to those of ^{11}C -acetate a well known heart PET imaging agent. Among the parameters studied were MPI, MVO_2 , and the impact of the kinetic model used to measure the heart functions. Both tracers were found adequate for the determination of left ventricle function (mainly LVEF). Although the kinetic models used to analyze the ^{11}C -acetoacetate were originally developed for ^{11}C -acetate, the derived parameters were found to be appropriate and consistent with the results obtained with ^{11}C -acetoacetate. ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate were used to assess impact of the metabolites on the kinetic modeling. Once the input function was corrected for the presence of metabolites, the 3-compartment model yielded MPI values similar to those obtained from the 2-compartment model. It is noteworthy that the level of metabolites in the blood was higher for ^3H -acetate as compared to ^{14}C -acetoacetate. Overall the result shows that ^{11}C -acetoacetate is a promising

radiotracer for the assessment of MPI. Our results from kinetic analysis and a simpler model using an exponential function show a good correlation between the myocardial oxygen consumption obtained with ^{11}C -acetoacetate and ^{11}C -acetate. The fact that ^{14}C -acetoacetate and ^3H -acetate are both concentrated to a similar extent into the myocardial mitochondria add support to the suitability of using ^{11}C -acetoacetate or ^{11}C -acetate to measure oxygen consumption.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grants MOP-86717, MOP-53094 and PRG-80137), a postgraduate scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (EC), the Canada Research Chairs Secretariat and NSERC Discovery grant (SCC), the Canadian Foundation for Innovation (SCC) and scholarships from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FB, ACC). The Etienne-Le Bel Clinical Research Center and the Research Center on Aging are both FRSQ-funded.

REFERENCES:

1. Armbrecht JJ, Buxton DB, Schelbert HR. Validation of $[1-^{11}\text{C}]$ acetate as a tracer for noninvasive assessment of oxidative metabolism with positron emission tomography in normal, ischemic, postischemic, and hyperemic canine myocardium. *Circulation*. 1990;81:1594-1605.
2. Chan SY, Brunken RC, Phelps ME, Schelbert HR. Use of the metabolic tracer carbon-11-acetate for evaluation of regional myocardial perfusion. *J Nucl Med*. 1991;32:665-672.
3. Beinert H, Green DE, Hele P, Hift H, Von Korff RW, Ramakrishnan CV. The acetate activating enzyme system of heart muscle. *J Biol Chem*. 1953;203:35-45.

4. Halestrap AP, Wang X, Poole RC, Jackson VN, Price NT. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 1997;80:17A-25A.
5. Fukao T, Song XQ, Mitchell GA, et al. Enzymes of ketone body utilization in human tissues: Protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA):3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatr Res.* 1997;42:498-502.
6. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience.* 2007;145:256-264.
7. Mallet RT, Sun J. Antioxidant properties of myocardial fuels. *Molecular & Cellular Biochemistry.* 2003;253:103-111.
8. Veech RL. The therapeutic implications of ketone bodies: The effects of ketone bodies in pathological conditions: Ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids.* 2004;70:309-319.
9. Squires JE, Sun J, Caffrey JL, Yoshishige D, Mallet RT. Acetoacetate augments beta-adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology.* 2003;284:H1340-7.
10. Davis EJ, Bremer J. Studies with isolated surviving rat hearts. interdependence of free amino acids and citric-acid-cycle intermediates. *European Journal of Biochemistry.* 1973;38:86-97.

11. Buck A, Wolpers HG, Hutchins GD, et al. Effect of carbon-11-acetate recirculation on estimates of myocardial oxygen consumption by PET.[see comment]. *J Nucl Med.* 1991;32:1950-1957.
12. Bentourkia M, Croteau E, Langlois R, et al. Cardiac studies in rats with ^{11}C -acetate and PET: A comparison with ^{13}N -ammonia. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2002;49:2322-2327.
13. van den Hoff J, Burchert W, Borner AR, et al. [1-(11)C]acetate as a quantitative perfusion tracer in myocardial PET. *J Nucl Med.* 2001;42:1174-1182.
14. Tremblay S, Ouellet R, Rodrigue S, Langlois R, Benard F, Cunnane SC. Automated synthesis of ^{11}C -acetoacetic acid, a key alternate brain fuel to glucose. *Applied Radiation & Isotopes.* 2007;65:934-940.
15. Pike VW, Eakins MN, Allan RM, Selwyn AP. Preparation of [1- ^{11}C]acetate--an agent for the study of myocardial metabolism by positron emission tomography. *International Journal of Applied Radiation & Isotopes.* 1982;33:505-512.
16. Barton RN. The interconversion and disposal of ketone bodies in untreated and injured post-absorptive rats. *Biochem J.* 1973;136:531-543.
17. Bergeron M, Cadorette J, Beaudoin J, et al. Performance evaluation of the LabPET APD-based digital PET scanner. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2009;56:10-16.
18. Bergeron M, Cadorette J, Bureau-Oxton C, et al. Performance evaluation of the LabPET12, a large axial FOV APD-based digital PET scanner. *Nuclear Science Symposium Conference Record (NSS/MIC), 2009 IEEE.* 2009:4017-4021.

19. Selivanov VV, Lapointe D, Bentourkia M, Lecomte R. Cross-validation stopping rule for ML-EM reconstruction of dynamic PET series: Effect on image quality and quantitative accuracy. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2001;48:883-889.
20. Croteau E, Benard F, Cadorette J, et al. Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. *Journal of Nuclear Medicine.* 2003;44:1655-1661.
21. Lee HB, Blaufox MD. Blood volume in the rat. *Journal of Nuclear Medicine.* 1985;26:72-76.
22. Takala TO, Nuutila P, Pulkki K, et al. 14(R,S)-[18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid as a tracer of free fatty acid uptake and oxidation in myocardium and skeletal muscle. *European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging.* 2002;29:1617-1622.
23. Croteau E, Lavallee E, Labbe SM, et al. Image-derived input function in dynamic human PET/CT: Methodology and validation with ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ^{18}F -fluorodeoxyglucose in brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;37:1539-1550.
24. Fishbein MC, Lei LQ, Rubin SA. Long-term propranolol administration alters myocyte and ventricular geometry in rat hearts with and without infarction. *Circulation.* 1988;78:369-375.
25. van den Hoff J, Burchert W, Borner AR, et al. [1-(^{11}C)]acetate as a quantitative perfusion tracer in myocardial PET. *Journal of Nuclear Medicine.* 2001;42:1174-1182.
26. Armbrecht JJ, Buxton DB, Brunken RC, Phelps ME, Schelbert HR. Regional myocardial oxygen consumption determined noninvasively in humans with [1- ^{11}C]acetate and dynamic positron tomography. *Circulation.* 1989;80:863-872.

27. Bengel FM, Permanetter B, Ungerer M, Nekolla S, Schwaiger M. Non-invasive estimation of myocardial efficiency using positron emission tomography and carbon-11 acetate--comparison between the normal and failing human heart. *Eur J Nucl Med*. 2000;27:319-326.
28. Ng CK, Huang SC, Schelbert HR, Buxton DB. Validation of a model for [1-¹¹C]acetate as a tracer of cardiac oxidative metabolism. *Am J Physiol*. 1994;266:H1304-15.
29. Taegtmeyer H, Hems R, Krebs HA. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem J*. 1980;186:701-711.
30. Bentourkia M, Tremblay S, Rousseau JA, Lecomte R, Cunnane SC. Study of ¹¹C-acetoacetate uptake by rat heart and brain using small animal PET imaging. *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference Record*. 2006;6:3497-3501.
31. Croteau E, Gascon S, Bentourkia M, et al. [(11)C]acetate rest-stress protocol to assess myocardial perfusion and oxygen consumption reserve in a model of congestive heart failure in rats. *Nucl Med Biol*. 2011;39:287-94.
32. Kuhle WG, Porenta G, Huang SC, et al. Quantification of regional myocardial blood flow using ¹³N-ammonia and reoriented dynamic positron emission tomographic imaging. *Circulation*. 1992;86:1004-1017.
33. Herrero P, Kim J, Sharp TL, et al. Assessment of myocardial blood flow using ¹⁵O-water and 1-¹¹C-acetate in rats with small-animal PET. *J Nucl Med*. 2006;47:477-485.

34. Brown MA, Myears DW, Bergmann SR. Noninvasive assessment of canine myocardial oxidative metabolism with carbon-11 acetate and positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:1054-1063.
35. van den Hoff J, Burchert W, Wolpers HG, Meyer GJ, Hundeshagen H. A kinetic model for cardiac PET with [1-carbon-11]-acetate. *Journal of Nuclear Medicine.* 1996;37:521-529.
36. Brown MA, Myears DW, Bergmann SR. Validity of estimates of myocardial oxidative metabolism with carbon-11 acetate and positron emission tomography despite altered patterns of substrate utilization. *J Nucl Med.* 1989;30:187-193.
37. Bian F, Kasumov T, Jobbins KA, et al. Competition between acetate and oleate for the formation of malonyl-CoA and mitochondrial acetyl-CoA in the perfused rat heart. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology.* 2006;41:868-875.
38. Menahan LA, Hron WT. Regulation of acetoacetyl-CoA in isolated perfused rat hearts. *European Journal of Biochemistry.* 1981;119:295-299.
39. Tokarska-Schlattner M, Lucchinetti E, Zaugg M, et al. Early effects of doxorubicin in perfused heart: Transcriptional profiling reveals inhibition of cellular stress response genes. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology.* 2010;298:R1075-88.
40. Russell RR, 3rd, Taegtmeyer H. Changes in citric acid cycle flux and anaplerosis antedate the functional decline in isolated rat hearts utilizing acetoacetate. *J Clin Invest.* 1991;87:384-390.

41. Eakins MN. Some investigations using ¹⁴C-labelled compounds into the design of radiopharmaceuticals suitable for the evaluation of myocardial metabolism. *International Journal of Applied Radiation & Isotopes*. 1979;30:459-461.
42. Sun KT, Chen K, Huang SC, et al. Compartment model for measuring myocardial oxygen consumption using [¹¹C]acetate. *J Nucl Med*. 1997;38:459-466.
43. Porenta G, Cherry S, Czernin J, et al. Noninvasive determination of myocardial blood flow, oxygen consumption and efficiency in normal humans by carbon-11 acetate positron emission tomography imaging. *Eur J Nucl Med*. 1999;26:1465-1474.

Chapitre 3.3. Article (2) amendé : ^{11}C -Acetoacetate - a new PET tracer of myocardial function (modification de la rationnelle)

Réécriture de l'article par justification de modification de l'hypothèse générale (la rationnelle). Validation de l'utilisation de l'acétoacétate en tant que marqueur de la cinétique des acides gras au niveau cardiaque.

Chapitre 3.3.1. Résumé de l'article en français

Objectif : Cette étude évalue le potentiel du ^{11}C -acétoacétate, un corps cétonique, comme radiotracer myocardique pour évaluer la fonction ventriculaire, l'indice de perfusion myocardique (MPI) et la consommation en oxygène du myocarde (MVO_2) par imagerie TEP.

Méthodes : Un groupe contrôle et un groupe traité à la doxorubicine afin d'induire une cardiomyopathie ont été évalués par acquisition cardiaque dynamique TEP au ^{11}C -acétoacétate. Une étude de validation été effectuée à l'aide du ^{14}C -acétoacétate pour évaluer la fonction d'entrée artérielle, la captation au niveau du myocarde et de ses mitochondries. Les valeurs obtenues dans l'évaluation de la présence des métabolites ^{14}C - CO_2 ont permis la validation de l'utilisation du modèle cinétique à trois compartiments. Le modèle à 3-compartiments a été comparé à un modèle à 2-compartiments pour le MPI et à la valeur d'une équation mono-exponentielle pour le MVO_2 .

Résultats : Dans ces conditions, les valeurs de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) démontrent une diminution de $24 \pm 4\%$ pour le groupe traité à la doxorubicine (test- t non-pairé, $p < 0,05$). L'analyse de captation ^{14}C -acétoacétate démontre, après 20 minutes post injection, près de quatre fois plus de radioactivité dans le cœur, deux fois plus dans les mitochondries ainsi qu'une augmentation de près de 50% du radiotracer natif (test- t non-pairé, $p < 0,05$), ceci est en accord avec une MVO_2 défaillante représentée par le groupe traité à la doxorubicine. Les index de perfusion myocardique (MPI) et de consommation en oxygène MVO_2 ont été obtenus à partir d'un modèle à 3-compartiments en utilisant la fonction d'entrée dérivée de l'image et le cœur. Le MPI et la MVO_2 obtenus chez le groupe traité ont respectivement diminué de $26,6 \pm 15,8\%$ et de $26,0 \pm 17,0\%$ (test- t non-pairé, $p < 0,05$). Des

valeurs similaires ont été obtenues lorsqu'ils ont été comparés à une analyse à deux compartiments pour le MPI et l'analyse d'une équation mono-exponentielle pour le MVO_2 .

Conclusion : Le ^{11}C -acétoacétate est un radiotracer fiable pour l'évaluation simultanée de la perfusion du myocarde, la consommation en oxygène et la fonction cardiaque. La méthode d'imagerie TEP proposée est nouvelle et simple, elle ouvre la voie à une caractérisation plus approfondie du rôle des corps cétoniques dans la physiopathologie cardiaque.

Chapitre 3.3.2. Texte de l'article

¹¹C-Acetoacetate - A New PET Tracer of Cardiac Function and Metabolism

Etienne Croteau¹, Sébastien Tremblay¹, Suzanne Gascon¹, Véronique Dumulon-Perreault¹, Sébastien M. Labbé³, Jacques A. Rousseau¹, Stephen C. Cunnane^{2,3}, André C. Carpentier³, François Bénard⁴ and Roger Lecomte¹

Running title: Myocardial ¹¹C-acetoacetate imaging

¹ Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, and Sherbrooke Molecular Imaging Center, Centre de recherche clinique Étienne-LeBel, QC, Canada.

² Research Center on Aging, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

³ Department of Medicine, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

⁴ Division of Nuclear Medicine, Department of Radiology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Author for correspondence and reprints:

Dr. Roger Lecomte

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology

Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. (819) 820-6868 ext. 14608

Fax (819) 829-3238

E-mail: Roger.Lecomte@USherbrooke.ca

First author:

Etienne Croteau

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology

Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. (819) 346-1110 ext. 11868

Fax (819) 829-3238

E-mail: Etienne.Croteau@USherbrooke.ca

Word count: 4467

Abstract

^{11}C -acetoacetate was characterized to establish its potential as a PET tracer for cardiac imaging for the assessment of heart function, myocardial perfusion index (MPI) and myocardial oxygen consumption (MVO_2). Cardiac-gated ^{11}C -acetoacetate PET images were acquired in male Fisher rats treated with doxorubicin to induce myocardial dysfunction the results were compared to those of a control group. Under these conditions, ^{11}C -acetoacetate yielded different left ventricular ejection fraction (LVEF) (paired t -test, $p < 0.001$). The ^{11}C -acetate kinetic model was used to analyze ^{11}C -acetoacetate data. The blood input function, the metabolite production along with the heart and mitochondrial uptake of acetoacetate was investigated using injection of ^{14}C -acetoacetate. The 3-compartment model approach, was validated by comparing the MPI values to those obtained from a 2-compartment model taking into account the results obtained from ^{14}C - CO_2 . For the MVO_2 the result from the 3-compartment model was compared to those obtained by the standard analytical approach using (k_{mono}) as an index of the initial myocardial clearance rate. MPI obtained using the 3- and 2-compartment models were well correlated ($r=0.73$) and shown a significant decrease for the doxorubicin treated group (unpaired t -test, $p < 0.01$). Similarly both analytical models showed a decrease in MVO_2 for the doxorubicin treated group (unpaired t -test, $p < 0.01$). The kinetic analysis models developed here, for ^{11}C -acetoacetate analysis was found to be valid and suitable for the assessment of myocardial dysfunction in rats. The proposed PET imaging procedure is novel and simple, and opens the way to a more thorough characterization of the role of ^{11}C -acetoacetate in cardiac pathophysiology.

Key Words: Acetoacetate, Left ventricular ejection fraction (LVEF), Myocardial perfusion index (MPI), Myocardial oxygen consumption (MVO_2).

Abbreviation list:

ECG: Electrocardiogram

IDIF: Image-derived input function

LVEF: Left ventricular ejection fraction

MPI: Myocardial perfusion index

MLEM: Maximum likelihood expectation maximization

MVO₂: Myocardial oxygen consumption

ROI: Region of interest

TAC: Time activity curve

INTRODUCTION

During intense physical exercise, fasting, fever or infection, the heart's energy reserves may become depleted and myocytes shift beyond glucose and fatty acids to also burn the ketone bodies, acetoacetate and beta-hydroxybutyrate, which are produced through hepatic ketogenesis. Acetoacetate is expected to have some similarity with ^{11}C -acetate a well-known myocardial PET radiotracer (1, 2) that reliably measures myocardial perfusion index (MPI) and indirectly provides an estimate of myocardial oxygen consumption (MVO_2). Acetate is directly metabolized to acetyl-CoA by acetyl-CoA synthetase in mitochondria (3), by which it enters the Krebs cycle. Acetyl-CoA can return to the cytoplasm where it can also be incorporated into sterol and fatty acid synthesis by the action of the ATP-citrate lyase (Figure 1).

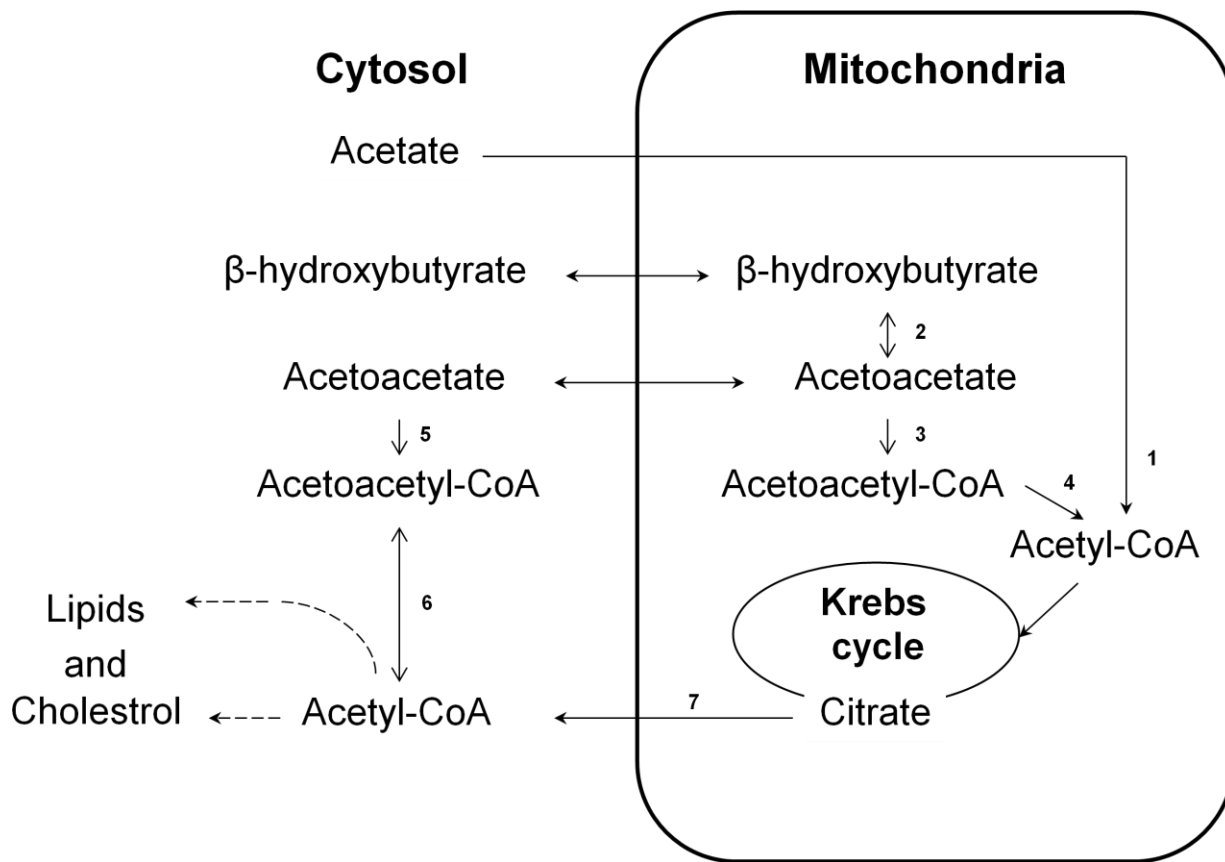


Figure 1 - Schematic representation of the metabolic pathways of acetate, beta-hydroxybutyrate and acetoacetate in the heart. Key to the enzymes involved: (1) acetyl-CoA synthetase; (2) Beta-hydroxybutyrate dehydrogenase; (3) succinyl-CoA 3-oxoacid CoA transferase; (4) acetoacetyl-CoA thiolase (mitochondrial); (5) acetoacetyl-CoA synthetase; (6) acetoacetyl-CoA thiolase (cytoplasmic); (7) ATP citrate lyase.

Acetoacetate cross the myocardial membrane using a monocarboxylic transporter (4) and is a substrate of the Krebs cycle. The mitochondrial oxidation of acetoacetate as an energy substrate first requires its conversion into acetoacetyl-CoA by succinyl-CoA-3-ketoacid transferase (5) and then into acetyl-CoA by acetoacetyl-CoA thiolase (3). Cytosolic acetoacetate can be incorporated into lipogenesis pathway. This involves conversion of acetoacetate first to acetoacetyl-CoA by acetoacetyl-CoA synthetase and then to cytoplasmic acetyl-CoA by acetoacetyl-CoA thiolase, which enters the lipids and cholesterol synthetic pathway.

Acetoacetate also present antioxidant properties (6, 7, 8) and in some models increased the contractility of the heart during ischemic episodes (9).

For the present study, our hypothesis was that although acetoacetate has a somewhat different metabolic fate than acetate, that ^{11}C -acetoacetate (10) has the potential to provide heart function, MPI and MVO_2 . This was verified in a doxorubicin induced cardiomyopathy model (11). The characterization of this ketone body could lead to a unique window on myocardial mitochondrial integrity, antioxidant capabilities and beta-adrenergic inotropic effects, all of which could have implications in congestive heart failure.

To validate ^{11}C -acetotacetate as a new *in vivo* PET tracer, we used dynamic gated PET imaging to non-invasively obtain the left ventricular ejection fraction (LVEF) together with MPI and MVO_2 using the kinetic model deigned to analyze ^{11}C -acetate data. ^{14}C -acetoacetate was used to validate the blood input function and the presence of radiotracers in heart mitochondria in view of the PET experiments to be carried later on. The MPI values from a 3-compartment model (12, 13) were compared to those obtained with a 2-compartment model (14) in which the input function was corrected for the presence of metabolites as derived from the ^{14}C experiment. For MVO_2 , the 3-compartment model was compared to a mono-exponential model not requiring an input function (1). Regardless of the analytical model used, the MPI and MVO_2 obtained with ^{11}C -acetoacetate showed significant decrease when compare to the doxorubicin treated group. We provide here evidence that ^{11}C -acetoacetate yield adequate results when used as an *in vivo* PET tracer to assess rat heart function in a doxorubicin induced cardiomyopathy model.

MATERIALS AND METHODS

Animal experiments:

All experiments were performed according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and of our local institution's Ethics Committee for Animal Experiments. Six rats received doxorubicin weekly, for 6 weeks (2 mg/kg i.v.; doxorubicin group) before being imaged (15). The dosage for the chemotherapy treatment was established from previous studies and from a weekly evaluation of change in the LVEF. The decrease in LVEF, as measured from the cardiac-gated ^{11}C -acetate image, was used as an index of doxorubicin cardiotoxicity (16). PET cardiac image acquisitions with ^{11}C -acetoacetate was conducted in 21 male Fisher rats, 15 healthy (290 ± 38 g), and 6 treated with doxorubicin (211 ± 34 g). The validation of the input function method with ^{14}C -acetoacetate was carried out in a group of 12 male Fisher rats 6 control (239 ± 62 g) and 6 doxorubicin treated rats (218 ± 33 g). All animals were given free access to food and water before the experiments.

Radiotracers:

[1- ^{11}C]-Acetoacetate was synthesized by carboxylation of the lithium isopropenolate anion produced by the addition of isopropenyl acetate to methyl lithium (17). For injection, ^{11}C -acetoacetate was formulated in a citrate-NaCl buffer at a final pH 5.5. Using an excess of NaOH, [3- ^{14}C]-acetoacetate was obtained from the alkaline hydrolysis of ethyl ^{14}C -acetoacetate (1.9 GBq/mL; American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA), purified on an anion exchange resin chromatography column (AG1X8; 200-400 mesh, Biorad, Montreal, Canada), and eluted

with citrate solution at pH 5.0 (18). The eluate was divided into 200 μL samples and the ^{14}C -acetoacetate fraction was collected and pooled.

PET Imaging:

Rats were prepared for PET imaging under anesthesia with isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, Canada) delivered through a nose cone at a concentration of 1.5% at 1 L/min oxygen flow. A catheter was installed into the tail vein for the injection of ^{11}C -acetoacetate. Blood β -hydroxybutyrate concentration was measured (PrecisionXtra, Abbott Laboratories) to exclude rats that had been fasting. Body temperature, respiration and heart rates were monitored for the entire duration of the experiment (SA Instruments Inc., New York, USA). The PET experiments were performed on a LabPET4 scanner (Gamma Medica) (19, 20), which has a transaxial and axial fields of view of 11 cm and 3.75 cm, respectively. A 20.5 min dynamic list-mode data acquisition with cardiac gating was initiated, followed 30 s later by the administration of the radiotracer using an injection pump (100 ± 25 MBq in 300 μL at 900 $\mu\text{L}/\text{min}$), followed by a 100 μL saline flush. The same procedure was replicated in every imaging session. Image planes were reconstructed on a 160×160 matrix (voxel size of $0.5 \times 0.5 \times 1.175$ mm³) with 10 iterations using a maximum likelihood expectation maximization (MLEM) algorithm implementing analytical detector response functions in the system matrix (21). Cardiac left ventricular functional parameters were extracted from the ^{11}C -acetoacetate list-mode PET data in the interval from 60 to 240 s post-injection, using a sequence of eight electrocardiogram (ECG)-gated frames based on the R-R intervals. These gated heart image series were also reconstructed with 10 MLEM iterations and used for the analysis of the LVEF. The Corridor4DM software (Segami Oasis, Laval, Canada) was used to reorient and analyse the

cardiac images, a procedure previously validated with a small rodent heart phantom (Figure 2) (22).

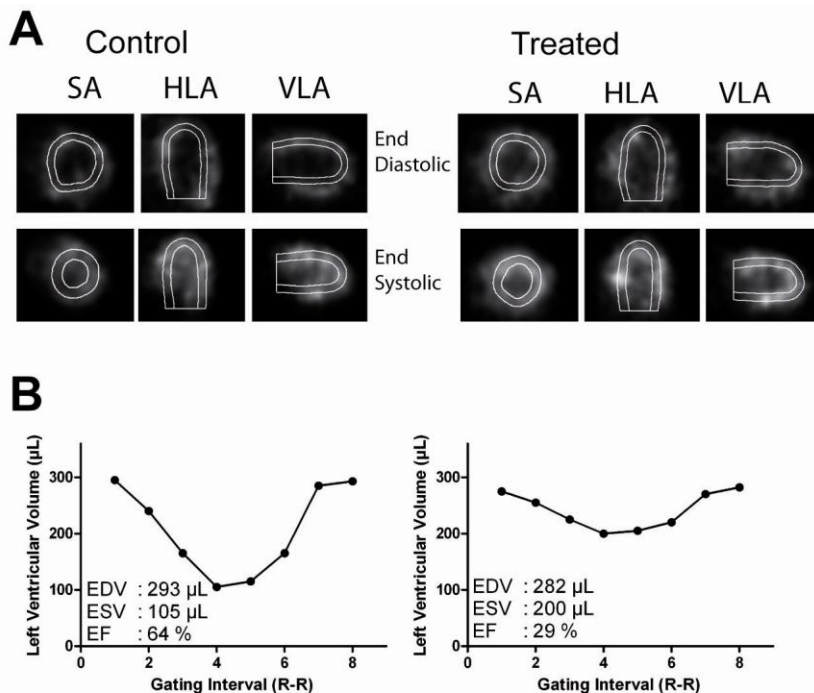


Figure 2- (A) Gated images obtained between 60 and 240 s after i.v. bolus injection of ^{11}C -acetoacetate (131 MBq) for the control rat (weight 272g) and (112 MBq) for the doxorubicin treated rat (weight 213g). End-diastolic and end-systolic; short axis (SA), horizontal long axis (HLA) and vertical long axis (VLA). (B) Left ventricular volume as a function of 8 gating interval from which the end-diastolic volume (EDV), end-systolic volume (ESV) and ejection fraction (LVEF) were be extracted (control vs treated).

^{14}C -acetoacetate experiment:

^{14}C -Acetoacetate (0.1 μmol) was injected within 1 min in the tail vein. Blood samples (75 μL) were collected manually from the femoral artery at 20, 40, 60, 90, 120, 150, 300, 600, 900 and 1200 s post-injection. At the end of the experiment, the animals were exsanguinated and the heart removed, washed with 0.9% NaCl, and kept on ice for further processing.

Plasma samples were divided into two fractions; one vial was counted immediately to obtain the ^{14}C in the blood while the remaining plasma was dried by speed vacuum and used for metabolite analysis. Before drying the samples, they were brought to a pH of 5.0 to promote the decomposition of acetoacetate ($pK_a = 3.77$) to the corresponding salts, water and carbon dioxide ($^{14}\text{C-CO}_2$). Our analysis was restricted to water and carbon dioxide since they are the major byproducts of acetoacetate decomposition. For each time point, the percentage of initial radioactivity in the blood was obtained by multiplying the blood specific activity by the whole blood volume computed as follows (23):

$$\text{Blood volume (mL)} = 0.06 \times \text{body weight (g)} + 0.77 \quad \text{Eq 1}$$

assuming a hematocrit of 42.7% (23). The time-activity curve (TAC) of ^{14}C -acetoacetate was calculated from the dried samples and the metabolite fractions were evaluated from the ratio between the plasma and the dry sample for each time point.

Procedure to evaluate uptake of heart mitochondria:

Heart tissue samples were homogenized (PowerGen 125, Fisher Scientific) in Chappell-Perry buffer solution at 4°C and pH 7.4 (10 mM KCL, 50 mM MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1 mM ATP pH 7.4). Homogenates were centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatant collected and centrifuged again at $12,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Following the second centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 mL Chappell-Perry buffer solution at pH 7.4. A sample of myocardial tissue and a 50 μl aliquot of the mitochondrial sample were kept frozen at -80°C for quantification of glutamate deshydrogenase (GDH) activity in order to correct for the fractional recovery of mitochondria

extracts from the heart tissues (24). To evaluate the radiotracer content of the isolated mitochondria, the activity of GDH, an enzyme specifically present in the mitochondria, was evaluated in both samples and then corrected. The amount of radioactivity in the heart and the mitochondria (extracted as described above) at 20 min post-injection were obtained from the specific activity of the heart tissue and that of the mitochondrial fraction corrected for the GDH enzymatic activity, divided by the injected dose. ^{14}C activity of plasma, heart and mitochondria was measured in a beta-counter (LKB Wallac, Norwalk, USA).

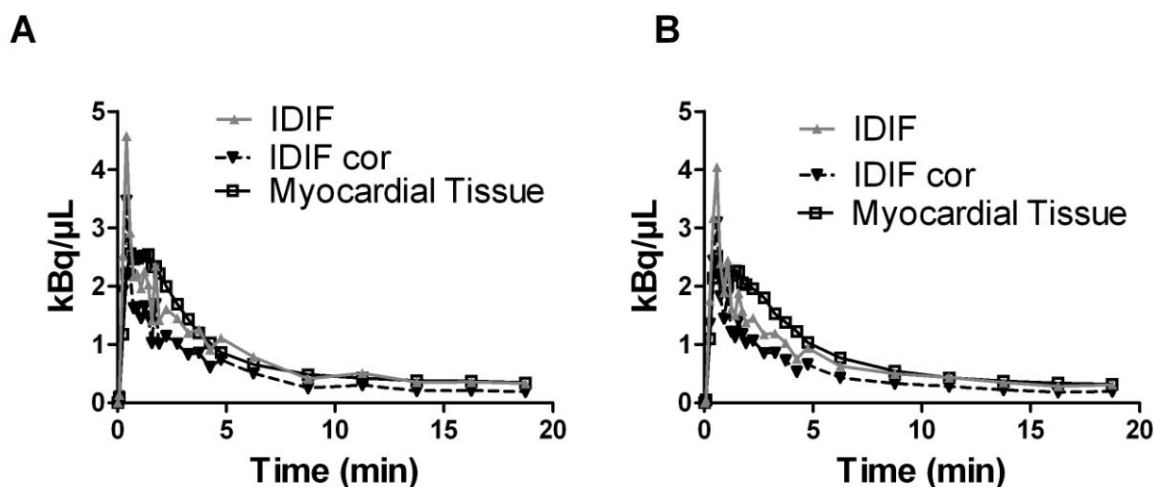


Figure 3 – Tissue and blood TACs from a 20 min list-mode PET acquisition, following iv administration of ^{11}C -Acetoacetate to untreated (A) (272 g: 131 MBq) and (B) Doxorubicin treated (213 g: 112 MBq) male Fischer rat. Image derived input function corrected for presence of metabolites (IDIF cor).

Pharmacokinetic analysis:

A dynamic series of 24 frames was sorted out from the list-mode data using the following sequence: 1×30 s, 12×10 s, 6×30 s, 6×150 s. Tissue TACs were generated from a region of interest (ROI) drawn manually on the myocardium in the summed frames of the interval from 1 to 3 min post-injection (Figure 3). The blood input function was obtained from a ROI drawn on

the left ventricular cavity and corrected using a phantom made of several hot or cold spheres of different diameters (25). The internal diameter of the left ventricle was used to obtain the spillover and partial volume recovery coefficient. Spillover correction was effected by multiplying the difference between heart and blood radioactivity, times the spillover correction factor. To assess the importance of correcting for the partial volume effect, the maximum intensity of the image-derived input function was compared to that of a blood sample. In the rat where the dimension of the left ventricular cavity has a radius of 2.6 ± 0.6 mm (26) the observed partial volume effect is less than 5% making it unnecessary to make a correction.

^{11}C -Acetoacetate data were analyzed using the 3-compartment kinetic model developed for ^{11}C -acetate to obtain MPI and MVO_2 according to the following equations (2 and 3) (12, 13):

$$C_t(t) = [A_1 \cdot \exp(-(k_2 + k_3) \cdot t) + A_2 \cdot \exp(-k_4 \cdot t)] \otimes C_p(t) + \text{TBV} \cdot C_{tot}(t) \quad \text{Eq 2}$$

where $A_1 = K_1 k_2 / (k_2 + k_3)$

$$A_2 = K_1 k_3 / (k_2 + k_3)$$

and

$$C_p(t) = [1 - a_0 \cdot (1 - \exp(-t \cdot \log 2 / m))] \cdot C_{tot}(t) \quad \text{Eq 3}$$

C_t , C_p and C_{tot} are the tissue, plasma and total arterial TACs. K_1 to k_4 are the rate constants, TBV is the tissue blood volume and a_0 and m are parameters representing the ^{11}C - CO_2 in plasma. The values of each of these parameters were obtained by fitting the PET data to the model. The contribution of the radioactivity due to metabolites in the plasma was estimated using equation 3.

The symbol \otimes indicates a convolution operation. K_1 represents MPI and k_2 represents an index of the MVO_2 .

Two alternative methods to derive MPI and MVO_2 values were also explored. First, for MPI, the results from the 3-compartment model were compared with those from a 2-compartment model (27) using an input blood function corrected for the metabolite fraction (MF). This model used an exponential fit and was previously validated with ^{14}C -acetoacetate data equation (4 and 5) (12):

$$C_t(t) = [K_1 \cdot \exp(-k_2 t)] \otimes C_p(t) \cdot [1 - MF(t)] \quad \text{Eq4}$$

$$MF(t) = (Y_0 - Plateau) \times e^{(k \times t)} + Plateau \quad \text{Eq5}$$

C_t and C_p are the tissue and plasma TACs, K_1 represents MPI. ^{14}C -acetoacetate experiment, Y_0 is the initial metabolite fraction, the *Plateau* corresponds to the upper limit of the blood metabolite ratio for the radiotracer and k is a rate constant describing the conversion rate of the radiotracer to metabolites in the blood.

Next, an indirect index of MVO_2 values obtained using either a 3-compartment kinetic analysis or a simple exponential fit of the initial portion of the rapid clearance phase of the myocardial TAC, (90 to 300 sec) post-injection of the radiotracer (K_{mono}). Armbrrecht et al. observed a linear correlation in dog studies between the single exponential (K_{mono} index) and MVO_2 when using ^{11}C -acetate (28):

$$C_t(t) = C_{t=0} \cdot \exp(-k_{mono} \cdot t) \quad \text{Eq 6}$$

In the previous equation, $C_{t=0}$ is the maximum tissue (myocardium) activity defined at time zero, the rate constant k_{mono} represents the MVO_2 index. This method avoids the need for a blood input function, since it only take into account the clearance portion of the myocardial tissue TAC (29, 30).

Statistical analysis:

Statistical analyses were performed using PRISM 5.0 software package (GraphPad Software, La Jolla, USA). Data obtained from the injection of ^{14}C -acetoacetate were compared using a two-tailed unpaired Student's t -test. Similarly, the difference in myocardial function parameters, MPI and MVO_2 kinetic analysis between control and doxorubicin treated groups were compared using a two-tailed unpaired Student's t -test. MPI and MVO_2 , we conducted a correlation (r) analysis and also for the MPI a bland and Altman plot difference analysis to compare the 3- and 2-compartment models. A probability value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Overall, respiratory rate and heart rate were not significantly different from one acquisition or experiment to the next. The blood level of β -hydroxybutyrate measured before the experiment was always within the normal range (below 0.4 mmol/L).

Left ventricular function:

An example of the ECG gated-images and cardiac function parameters obtained with ^{11}C -acetoacetate in rats are displayed in Figure 2. On the average, both ^{11}C -acetoacetate control and treated yielded different left ventricular function parameters, *i.e.* statistically significant for the

diastolic volumes (283 ± 28 versus 222 ± 37 μL), systolic volumes (128 ± 15 versus 159 ± 29 μL) or LVEF (55 ± 5 versus 31 ± 4 %) (unpaired t -test $p < 0.05$; Figure 4).

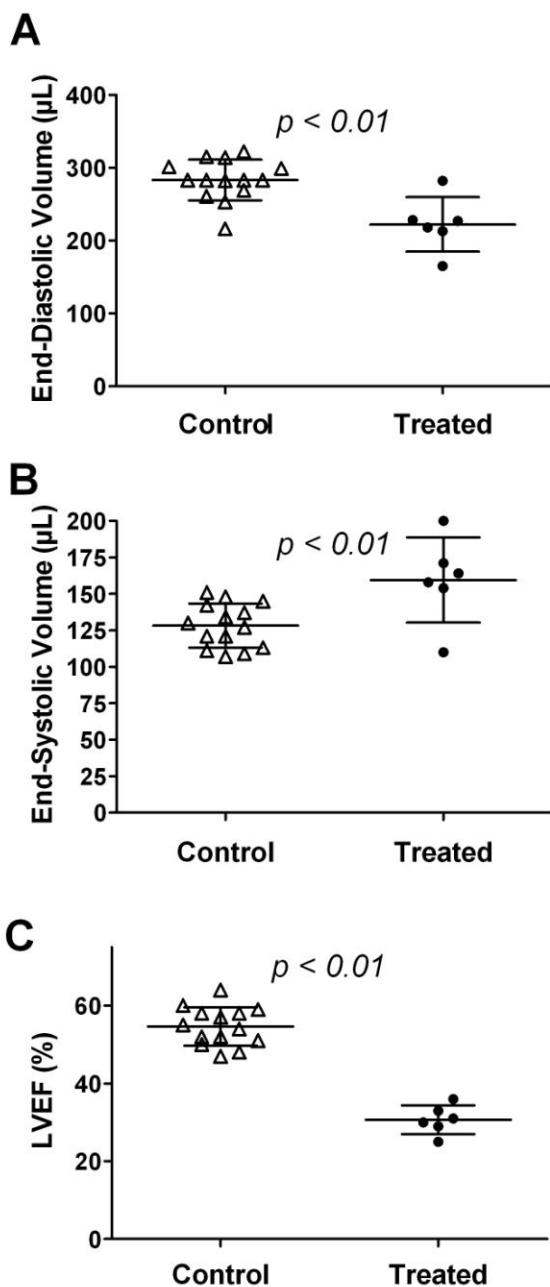


Figure 4 - Scatter plot with mean \pm SD of diastolic volume (A), systolic volume (B) and left ventricle ejection fraction (LVEF) (C) of ^{11}C -acetoacetate. The p values are from an unpaired two-tailed Student t -test.

Input function and metabolites fractions:

The MPI and MVO_2 values were obtained from a 3-compartment model developed for ^{11}C -acetate. In order to validate the results obtained with this approach, the MPI and the MVO_2 were also calculated using a 2-compartment model for MPI and an exponential fit for MVO_2 . By validating our model first with ^{14}C -acetoacetate we were able to evaluate the metabolite patterns and generate a blood input functions corrected for the presence of metabolites, which was then used for the 2-compartment model.

The metabolic fates of ^{14}C -acetoacetate were significantly different (Table 1 and Figure 5). At 20 min post-injection, the uptake of ^{14}C -acetoacetate by the heart was more than three time higher in the doxorubicin treated model in comparison to the control ($p = 0.002$), despite the fact that the mitochondria of the control group contained twice as much ^{14}C -acetoacetate ($p = 0.028$).

In the ^{14}C -acetoacetate experiments, the measurement of blood metabolites ($^{14}\text{CO}_2$) and the ^{14}C , suggest that the blood clearance rate of the doxorubicin treated group was somewhat slower than that the controls. But this difference was small and was not statistically significant at 20 minutes post injection (unpaired t-test $p \geq 0.05$, blood analysis with ^{14}C used).

Table 1

Biodistribution of ^{14}C -acetoacetate in the blood, heart and myocardial mitochondria, at 20 minutes post injection.

	Control (N=6) Means \pm SD	Treated [#] (N=6) Means \pm SD	<i>p</i> value ^{††}
Heart/			
Heart*	0.24% \pm 0.05%	0.84% \pm 0.16%	0.002
Myocardial Mitochondria * [†]	0.19% \pm 0.09%	0.29% \pm 0.07%	0.028
Blood/			
Blood Raw*	2.4% \pm 1.4%	3.4% \pm 0.9%	0.171
Blood cor*	1.3% \pm 0.8%	2.2% \pm 0.7%	0.067
Metabolite fraction ^{14}C -CO ₂	45.1% \pm 11.1%	39.1% \pm 6.2%	0.247

* Percent injected dose (% i.d.)

[#] Weekly treatment (2mg/kg i.v. doxorubicin) for 6 weeks.

[†] The myocardial mitochondria radioactivity was determined with the GDH correction.

^{††} Unpaired *t* test, control vs, treated groups.

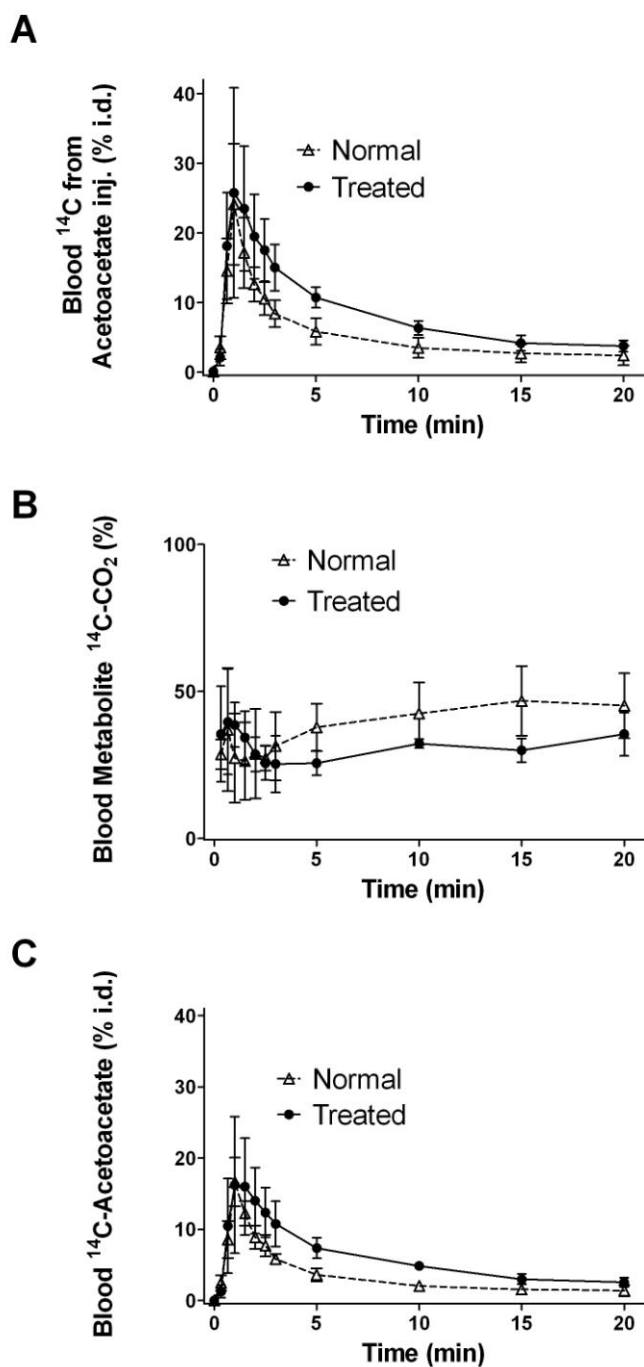


Figure 5 - Results following the administration of ^{14}C -acetoacetate control (triangle) and doxorubicin treated groups (square): (A) blood radioactivity data as a % of the total injected dose (% i.d.); (B) percentage of metabolites in the blood; and (C) % injected dose of ^{14}C -acetoacetate in blood after correction for the presence of metabolites. Data are mean \pm SD.

Myocardial perfusion index (MPI; K_1):

The kinetic analyses of ^{11}C -acetoacetate MPI was correctly estimated whether obtained from the 3- or 2-compartment models (Eq 2-3 or 4-5). The Pearson correlation coefficients ($r = 0.73$) and the Bland-Altman plot indicate that both methods will yield equivalent results (Figures 6). The MPI showed a decrease in the doxorubicin treated group of $26.6 \pm 15.8 \%$ with the 3-compartment model and of $14.0 \pm 10.7\%$ with the 2- compartment model.

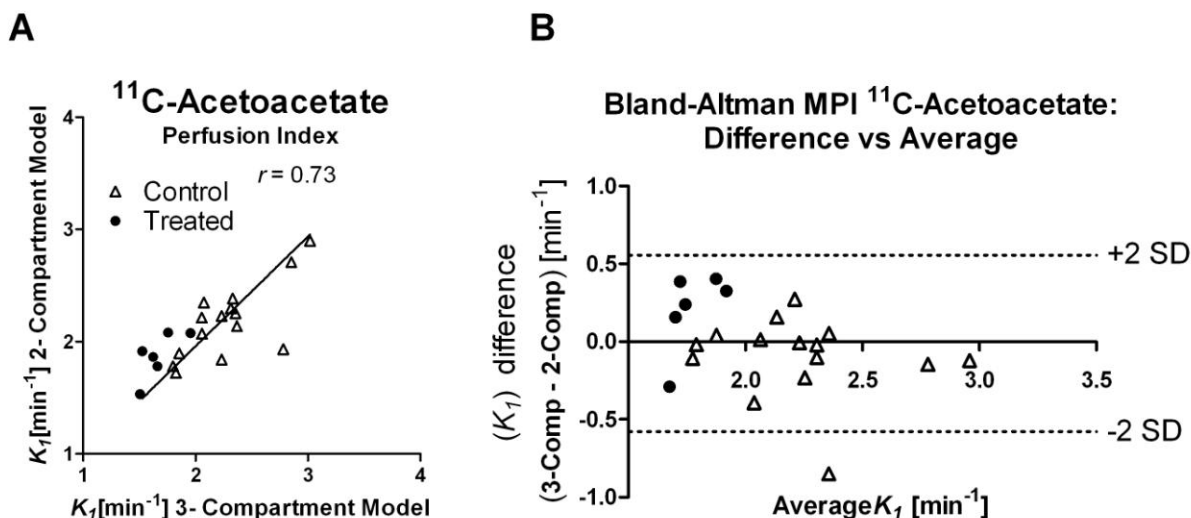


Figure 6 – (A) Correlation of myocardial perfusion index (MPI; K_1) values derived from the 3- and 2-compartment kinetic models for ^{11}C -acetoacetate and (B) Bland and Altman plot. The 2-compartment model used IDIF data corrected for the presence of metabolites from the ^{14}C -acetoacetate experiment were the 3-compartment was fit in the kinetic model. Pearson correlation coefficient (r) are reported.

Once the ^{14}C -acetoacetate data had been corrected for loss of tracer to metabolites, MPI obtained with the 3-compartment model was comparable to that obtained with the 2-compartment model. Overall, both the 3- and 2-compartment kinetic models yielded similar MPI ^{11}C -acetoacetate values, with average K_1 values of $2.3 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$ and $2.2 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$, respectively,

for control, and $1.7 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ and $1.9 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$, respectively, for the doxorubicin treated groups. In each model, the MPI values obtained for ^{11}C -acetotacetate using the acetate kinetic model were consistently and significantly lower for the treated group (unpaired t -test, $p < 0.05$).

Myocardial oxygen consumption (MVO_2 ; k_2 or k_{mono}):

MVO_2 index values obtained with the 3-compartment model (k_2) (Eq 2 & 3) were compared to those obtained from a mono-exponential fit (k_{mono}) applied to the initial part of the heart radioactivity clearance curve (Eq 6). MVO_2 estimations from the 3-compartment model and the mono-exponential approach yield similar values (Figure 7). MVO_2 values obtained for ^{11}C -acetoacetate in the control and doxorubicin treated rats were respectively $0.87 \pm 0.17 \text{ min}^{-1}$ and $0.65 \pm 0.11 \text{ min}^{-1}$ for the 3-compartment model, and $0.27 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ and $0.18 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$ for the mono-exponential fit. Although these two methods yield different absolute index values estimated of MVO_2 , both show similar decrease in MVO_2 following doxorubicin treatment, i.e. $26 \pm 17 \%$ for the 3-compartment model and $32 \pm 21 \%$ for the mono-exponential model (unpaired t -test, $p < 0.05$).

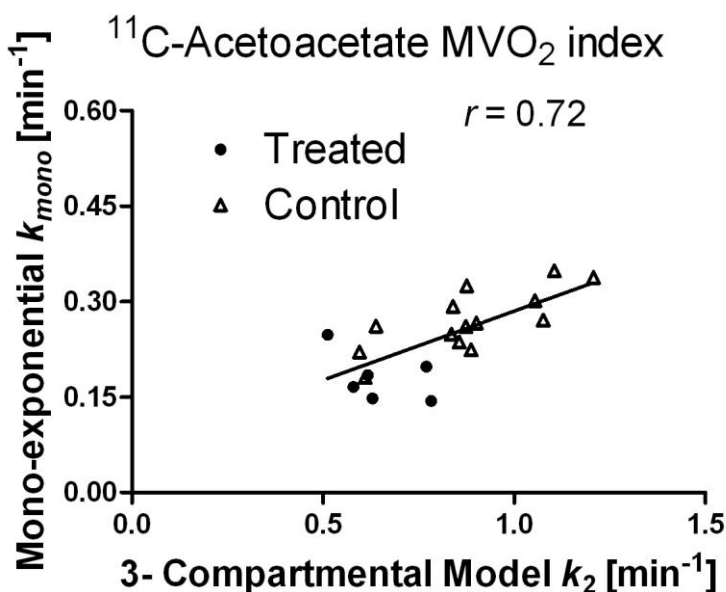


Figure 7 - Correlation of MVO₂ values measured with ¹¹C-acetoacetate using the 3-compartment model and the mono-exponential fit. Pearson correlation coefficients (r) are reported.

DISCUSSION

Although the cardiac uptake of ¹¹C-acetoacetate had been briefly reported (31), to our knowledge, this is the first systematic analysis of the myocardial metabolism of ¹¹C-acetoacetate using PET. Since acetoacetate partially shares the same metabolic pathways as acetate in the heart, using the same kinetic model seem appropriate to initially explore its potential and should provides useful insight for the validation of ¹¹C-acetoacetate as a myocardial radiotracer. This study offered the opportunity to assess in rats using ¹¹C-acetoacetate the effect of a doxorubicin induced cardiomyopathy on oxidative stress in the presence of a decrease LVEF.

We found that ¹¹C-acetoacetate yield similar decrease in heart function, MPI and MVO₂ independently of the kinetic model we used. However, because acetoacetate has a somewhat different metabolic fate than acetate, ¹¹C-acetoacetate might be able to provide additional

information on the metabolic integrity of the myocardial energy production chain that is not necessarily available in a PET study with ^{11}C -acetate (6, 9, 32).

The change measured here, in the heart function, MPI and MVO_2 indicated that ketone bodies could be used adequately for the diagnostic of cardiac disease. The reduction in the ejection fraction observed with ^{11}C -acetoacetate is in accordance with what was published by other groups investigating doxorubicin treatment models (11).

^{11}C -Acetoacetate kinetic modeling with ^{14}C -acetoacetate was necessary to correctly interpret the PET data. These data was used to estimate the amount of ^{11}C -acetoacetate present in the heart and in myocardial mitochondria and allowed us to correlate PET data with blood radioactivity level and loss of the original radiotracers to metabolism.

The understanding of the catabolism acetoacetate gained from the results of the ^{14}C -acetoacetate experiment for the presence of metabolites in the blood. The ^{14}C -acetoacetate TACs in the blood were used to correct the input function for the presence of metabolites. The MPI index (K_1), was evaluated using two different kinetic models, a 3-compartment model where the metabolite contribution are estimated by the model and a 2-compartment model where the imaged-derived input function was already corrected for the presence of metabolites using an equation derived from the data obtained with the ^{14}C -acetoacetate experiments.

^{11}C -acetoacetate MPI values, using the kinetic analysis of ^{11}C -acetate model, are lower than those obtained with ^{11}C -acetate. ^{11}C -Acetate is a well-established PET tracer which has been validated against direct measurements of myocardial perfusion with microspheres (12), as well as against two common PET radiotracers of myocardial perfusion, $^{13}\text{NH}_3$ (33) and ^{15}O -water (34). With ^{11}C -acetate, MPI is usually obtained from the product of K_1 and a coefficient related

to the extraction fraction (14, 34, 35). The extraction fraction might have an impact on the product term used for the MPI calculation, suggesting the necessity to select an appropriate constant to obtain accurate MPI values when using ^{11}C -acetoacetate. Furthermore, the kinetic models for ^{11}C -acetate used here were primarily and previously validated to provide reliable oxygen consumption index over a wide range of myocardial workloads in dogs (1,12) and humans (28). However, the rat model is particularly challenging, as the validation of the myocardial oxygen consumption would require a direct access to the left anterior descending coronary artery for injection of the radiotracer and blood sampling through the coronary sinus and the vein draining the myocardial region (1). Due to the difficulty associated with performing such a procedure in the rat, an indirect measurement such as the rate-pressure product (RPP) was used (16). While not perfect, this indirect method has shown a good correlation between RPP and MVO_2 . Taegtmeyer et al. in a rat perfused heart experiment reported a relationship between the oxygen consumption of acetoacetate and acetate (36). Similar results were also observed when the rat heart uptake of 3- ^{14}C -acetoacetate and 1- ^{14}C -acetate were compared (37). In the healthy condition, the acetoacetate uptake in the heart and its oxidative metabolism were also found to be similar to that of acetate (29, 40). Therefore, even though it follows different metabolic pathways, the ^{11}C -acetoacetate kinetics analyzed with the same 3-compartment model is likely to mimic the MVO_2 results obtained with ^{11}C -acetate. Further investigation is certainly justified to confirm these observations. The exact faith of ^{11}C -acetoacetate in mitochondria is not fully establish yet, but we believe that the supplementary step involve in the processing of acetoacetate by degradative thiolases is the main difference between the metabolic processing of acetate and acetoacetate in the heart (29). The metabolic difference between acetoacetate and

acetate could be advantageously used in the characterization by PET imaging of cardiotoxic processes.

The ketone body, acetoacetate play several roles in the cardiac metabolic processes. Acetoacetate may have a cardioprotective effect against oxidative stress helping to restore the glutathione/glutathione disulfide ratio, a known antioxidant factor. Using ^{11}C -acetoacetate will opens the way to a better characterization of the role of ketone body in the cardiac pathophysiology.

^{11}C -acetoacetate is a promising new PET myocardial radiotracer that may have an important role in assessing heart function, MPI, MVO_2 and ketone metabolism in a single short dynamic-gated imaging session. Investigating ketogenic metabolic pathways in heart ischemia and cardiomyopathy may open new diagnostic opportunities. For instance, MPI, MVO_2 and heart function evaluated with ^{11}C -acetoacetate provide accurate information about the state of cardiomyopathy induce with doxorubicin (8, 9).

CONCLUSION

The aim of the study was to investigate the feasibility of using the ketone body - ^{11}C -acetoacetate - as a radiotracer for PET imaging of heart function. The metabolic properties of ^{11}C -acetoacetate was analyzed with the kinetic model used for ^{11}C -acetate a well known heart PET imaging agent, among the parameters studied were MPI, MVO_2 , and the heart functions. The extend of cardiomyopathy induce with doxorubicin was assessed by measuring the left ventricle function (mainly LVEF). Although the kinetic models used to analyze the ^{11}C -acetoacetate were developed for ^{11}C -acetate the results were found to be appropriate and consistent, both showing a decrease and an altered MPI and MVO_2 for the doxorubicin treated

group. ^{14}C -acetoacetate was used to assess impact of the metabolites on the kinetic modeling. Once the input function was corrected for the presence of metabolites, the 3-compartment model yielded MPI values similar to those obtained from the 2-compartment model. MVO_2 values showed a decrease with both the 3-compartment and the mono-exponential evaluation. Overall the result shows that ^{11}C -acetoacetate is a promising radiotracer for the assessment of cardiomyopathy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grants MOP-86717, MOP-53094 and PRG-80137), a postgraduate scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (EC), the Canada Research Chairs Secretariat and NSERC Discovery grant (SCC), the Canadian Foundation for Innovation (SCC) and scholarships from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FB, ACC). The Etienne-Le Bel Clinical Research Center and the Research Center on Aging are both FRSQ-funded.

REFERENCES:

1. Armbrecht JJ, Buxton DB, Schelbert HR. Validation of [1-11C]acetate as a tracer for noninvasive assessment of oxidative metabolism with positron emission tomography in normal, ischemic, postischemic, and hyperemic canine myocardium. *Circulation*. 1990;81:1594-1605.
2. Chan SY, Brunken RC, Phelps ME, Schelbert HR. Use of the metabolic tracer carbon-11-acetate for evaluation of regional myocardial perfusion. *J Nucl Med*. 1991;32:665-672.
3. Beinert H, Green DE, Hele P, Hift H, Von Korff RW, Ramakrishnan CV. The acetate activating enzyme system of heart muscle. *J Biol Chem*. 1953;203:35-45.
4. Halestrap AP, Wang X, Poole RC, Jackson VN, Price NT. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *Am J Cardiol*. 1997;80:17A-25A.
5. Fukao T, Song XQ, Mitchell GA, et al. Enzymes of ketone body utilization in human tissues: Protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA):3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatr Res*. 1997;42:498-502.
6. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*. 2007;145:256-264.
7. Mallet RT, Sun J. Antioxidant properties of myocardial fuels. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 2003;253:103-111.
8. Veech RL. The therapeutic implications of ketone bodies: The effects of ketone bodies in pathological conditions: Ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and

- mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. 2004;70:309-319.
9. Squires JE, Sun J, Caffrey JL, Yoshishige D, Mallet RT. Acetoacetate augments beta-adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*. 2003;284:H1340-7.
10. Davis EJ, Bremer J. Studies with isolated surviving rat hearts. interdependence of free amino acids and citric-acid-cycle intermediates. *European Journal of Biochemistry*. 1973;38:86-97.
11. Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicology & Applied Pharmacology*. 2002;185:218-227.
12. Buck A, Wolpers HG, Hutchins GD, et al. Effect of carbon-11-acetate recirculation on estimates of myocardial oxygen consumption by PET.[see comment]. *J Nucl Med*. 1991;32:1950-1957.
13. Bentourkia M, Croteau E, Langlois R, et al. Cardiac studies in rats with ^{11}C -acetate and PET: A comparison with ^{13}N -ammonia. *IEEE Trans Nucl Sci*. 2002;49:2322-2327.
14. van den Hoff J, Burchert W, Borner AR, et al. [1-(^{11}C)]acetate as a quantitative perfusion tracer in myocardial PET. *J Nucl Med*. 2001;42:1174-1182.
15. Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, et al. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;200:159-168.

16. Croteau E, Gascon S, Bentourkia M, et al. [(11)C]acetate rest-stress protocol to assess myocardial perfusion and oxygen consumption reserve in a model of congestive heart failure in rats. *Nucl Med Biol.* 2011;39:287-94.
17. Tremblay S, Ouellet R, Rodrigue S, Langlois R, Benard F, Cunnane SC. Automated synthesis of ¹¹C-acetoacetic acid, a key alternate brain fuel to glucose. *App Radiat Isot.* 2007;65:934-940.
18. Barton RN. The interconversion and disposal of ketone bodies in untreated and injured post-absorptive rats. *Biochem J.* 1973;136:531-543.
19. Bergeron M, Cadorette J, Beaudoin J, et al. Performance evaluation of the LabPET APD-based digital PET scanner. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2009;56:10-16.
20. Bergeron M, Cadorette J, Bureau-Oxton C, et al. Performance evaluation of the LabPET12, a large axial FOV APD-based digital PET scanner. *Nuclear Science Symposium Conference Record (NSS/MIC), 2009 IEEE.* 2009:4017-4021.
21. Selivanov VV, Lapointe D, Bentourkia M, Lecomte R. Cross-validation stopping rule for ML-EM reconstruction of dynamic PET series: Effect on image quality and quantitative accuracy. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2001;48:883-889.
22. Croteau E, Benard F, Cadorette J, et al. Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. *J Nucl Med.* 2003;44:1655-1661.
23. Lee HB, Blaufox MD. Blood volume in the rat. *J Nucl Med.* 1985;26:72-76.

24. Takala TO, Nuutila P, Pulkki K, et al. 14(R,S)-[18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid as a tracer of free fatty acid uptake and oxidation in myocardium and skeletal muscle. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29:1617-1622.
25. Croteau E, Lavallee E, Labbe SM, et al. Image-derived input function in dynamic human PET/CT: Methodology and validation with ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ^{18}F -fluorodeoxyglucose in brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37:1539-1550.
26. Fishbein MC, Lei LQ, Rubin SA. Long-term propranolol administration alters myocyte and ventricular geometry in rat hearts with and without infarction. *Circulation*. 1988;78:369-375.
27. van den Hoff J, Burchert W, Borner AR, et al. [1-(11C)]acetate as a quantitative perfusion tracer in myocardial PET. *J Nucl Med*. 2001;42:1174-1182.
28. Armbrecht JJ, Buxton DB, Brunken RC, Phelps ME, Schelbert HR. Regional myocardial oxygen consumption determined noninvasively in humans with [1- ^{11}C]acetate and dynamic positron tomography. *Circulation*. 1989;80:863-872.
29. Bengel FM, Permanetter B, Ungerer M, Nekolla S, Schwaiger M. Non-invasive estimation of myocardial efficiency using positron emission tomography and carbon-11 acetate--comparison between the normal and failing human heart. *Eur J Nucl Med*. 2000;27:319-326.
30. Ng CK, Huang SC, Schelbert HR, Buxton DB. Validation of a model for [1- ^{11}C]acetate as a tracer of cardiac oxidative metabolism. *Am J Physiol*. 1994;266:H1304-15.

31. Bentourkia M, Tremblay S, Rousseau JA, Lecomte R, Cunnane SC. Study of ^{11}C -acetoacetate uptake by rat heart and brain using small animal PET imaging. *IEEE Nucl Sci Symp Med Imaging Conference Record*. 2006;6:3497-3501.
32. Brown MA, Myears DW, Bergmann SR. Validity of estimates of myocardial oxidative metabolism with carbon-11 acetate and positron emission tomography despite altered patterns of substrate utilization. *J Nucl Med*. 1989;30:187-193.
33. Kuhle WG, Porenta G, Huang SC, et al. Quantification of regional myocardial blood flow using ^{13}N -ammonia and reoriented dynamic positron emission tomographic imaging. *Circulation*. 1992;86:1004-1017.
34. Herrero P, Kim J, Sharp TL, et al. Assessment of myocardial blood flow using ^{15}O -water and ^{11}C -acetate in rats with small-animal PET. *J Nucl Med*. 2006;47:477-485.
35. Sun KT, Chen K, Huang SC, et al. Compartment model for measuring myocardial oxygen consumption using $[1-^{11}\text{C}]$ acetate. *J Nucl Med*. 1997;38:459-466.
36. Taegtmeier H, Hems R, Krebs HA. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem J*. 1980;186:701-711.
37. Eakins MN. Some investigations using ^{14}C -labelled compounds into the design of radiopharmaceuticals suitable for the evaluation of myocardial metabolism. *Int J Appl Radiat Isot*. 1979;30:459-461.

Chapitre 3.4. Réponses (en anglais) aux questions de l'évaluateur externe concernant l'article (2) et l'article (2) amendé

(Comments from external reviewer not addressed in text revision)

1. The justification for the development of C-11-acetoacetate as a novel tracer is not entirely clear. One of the potential reasons is related to its apparent effect on oxidative stress. It is implied that the tracer reflects oxidative stress (noted in the introduction) however the experiments were not designed to test this. This should be re-worded and clarified.

The paper was reworded and amended: The experiment was designed to better understand the role of the ketone body ^{11}C -acetoacetate in cardiac metabolism and to assess its suitability for the monitoring of mitochondrial defect and oxidative stress. All ^{11}C -acetate experiments were removed and replaced by the doxorubicin treated group. In addition, ^{14}C -acetoacetate was analyzed in both groups.

2. Throughout experiment 2 (and also in experiment 3) it's indicated that the measurement is that of myocardial oxygen consumption. However it should be noted that C-11-acetate provides a measure of TCA cycle flux and therefore oxidative metabolism, but is an indirect estimate of myocardial oxygen consumption. This point should be clearly made as the methods here have not been truly validated against objective measures of myocardial oxygen consumption in rats. The difficulty in such validation measurements in rat models notwithstanding it is important to identify this limitation.

Article (2) amended: The following sections of the amended paper were modified.

Introduction(1st paragraph second sentence): Acetoacetate is expected to have some similarity with ¹¹C-acetate, a well-known myocardial PET radiotracer (1, 2) that reliably measures myocardial perfusion index (MPI) and indirectly provides an estimate of myocardial oxygen consumption (MVO₂).

Methods(10th paragraph first sentence): Next, an indirect index of MVO₂ values obtained using either a 3-compartment kinetic analysis or a simple exponential fit of the initial portion of the rapid clearance phase of the myocardial TAC.

Discussion(6th paragraph fifth sentence): Furthermore, the kinetic models for ¹¹C-acetate used here were primarily and previously validated to provide reliable oxygen consumption index over a wide range of myocardial workloads in dogs (1,12) and humans (28). However, the rat model is particularly challenging, as the validation of the myocardial oxygen consumption would require a direct access to the left anterior descending coronary artery for injection of the radiotracer and blood sampling through the coronary sinus and the vein draining the myocardial region (1). Due to the difficulty associated with performing such a procedure in the rat, an indirect measurement such as the rate-pressure product (RPP) was used (16). While not perfect, this indirect method has shown a good correlation between RPP and MVO₂. Taegtmeier et al. in a rat perfused heart experiment reported a relationship between the oxygen consumption of acetoacetate and acetate (36). Similar results were also observed when the rat heart uptake of 3-¹⁴C-acetoacetate and 1-¹⁴C-acetate were compared (37). In the healthy condition, the acetoacetate uptake in the heart and its oxidative metabolism were also

found to be similar to that of acetate (29, 40). Therefore, even though it follows different metabolic pathways, the ^{11}C -acetoacetate kinetics analyzed with the same 3-compartment model is likely to mimic the MVO_2 results obtained with ^{11}C -acetate. Further investigation is certainly justified to confirm these observations.

Article (3): We have mentioned that ^{11}C -acetate is an indirect method to obtain estimate of myocardial oxygen consumption in the abstract, the introduction, the results and the figures. Also reported in the discussion is the indirect validation through RPP which indicated a correlation of ^{11}C -acetoacetate uptake with the MVO_2 index.

3. The model nomenclature uses terms of one tissue compartment model and three compartment models. Effectively, a one tissue compartment model is a two compartment model and a three compartment model is a two tissue compartment model. The candidate should use consistent nomenclature for these different models.

The nomenclature in the reviewed paper was changed to 3-compartment model and 2-compartment model.

4. The candidate reports correlations, but also useful would be Bland-Altman plot displays. Bland-Altman plots were included in the paper and the revised version of the paper.

5. As with oxygen consumption, the experiments have not truly validated C-11-acetoacetate for the measurement of flow since direct flow measurements have not been undertaken. Rather, it has been validated against C-11-acetate flow measurements.

The term, myocardial perfusion index (MPI) was use in place of myocardial blood flow (MBF). The MPI refer to the blood flow in min^{-1} whereas the MBF is usually a rate in milliliters per minutes per gram. ^{11}C -acetate MBF measurements were validated directly against measurements with microspheres or indirectly with ^{15}O -water as well as with others PET perfusion radiotracers in several animal models. MBF measured by ^{11}C -acetate was already validated with microspheres and ^{15}O -Water in healthy rats (J Nucl Med 2006;47:477-485). According to the published literature, the metabolic faith of 3- ^{14}C -acetoacetate is similar to that of 1- ^{14}C -acetate. There are good reasons to believe that ^{11}C -acetate and ^{11}C -acetoacetate would behave similarly as flow tracers. Nevertheless, it is true that such a validation is needed to establish an accurate kinetic model of the MBF for ^{11}C -acetatoacetate. The discussion has been reworded in the amendment paper as follow (*6th paragraph second sentence*): ^{11}C -Acetate is a well-established PET tracer which has been validated against direct measurements of myocardial perfusion with microspheres (12), as well as against two common PET radiotracers of myocardial perfusion, $^{13}\text{NH}_3$ (33) and ^{15}O -water (34). With ^{11}C -acetate, MPI is usually obtained from the product of K_1 and a coefficient related to the extraction fraction (14, 34, 35). The extraction fraction might have an impact on the product term used for the MPI calculation, suggesting the necessity to select an appropriate constant to obtain accurate MPI values when using ^{11}C -acetoacetate.

6. The measurements of the flow and MVO₂ are compared by correlation. It was unclear why such correlations were not presented for left ventricular ejection fraction measurements.

The article (2) was changed and we have added a Bland-Altman graph reporting data for the heart function.

The article (2) amended doesn't need this addition considering that the ¹¹C-acetate experiment was removed.

Chapitre 4. Article (3)

¹¹C-Acetate rest-stress protocol to assess myocardial perfusion and oxygen consumption reserve in a model of congestive heart failure in rats.

Etienne Croteau, François Bénard, Suzanne Gascon, M'hamed Bentourkia, Réjean Langlois, Jacques A. Rousseau, Roger Lecomte.

« Nuclear Medicine and Biology » (2012;39(2):287-94)

Ma contribution a été majeure (>85%) dans l'élaboration, la conception, l'expérimentation, l'analyse et la rédaction de ces travaux.

Chapitre 4.1. Résumé de l'article en français

Objectif : Cette étude décrit une méthode d'examen de repos/effort au ^{11}C -acétate par imagerie dynamique TEP afin d'obtenir les réserves myocardiques par une estimation indirecte de la perfusion myocardique (MBF) et de la consommation en oxygène du myocarde (MVO_2) chez le rat. L'analyse cinétique cardiaque a été appliquée sur un modèle d'insuffisance cardiaque induite par un agent de chimiothérapie, la doxorubicine, une anthracycline reconnue pour sa cardiotoxicité.

Méthodes : La méthode a d'abord été validée chez un groupe de rats sains soumis à un large éventail de charge de travail cardiaque avec réduction et augmentation de demande énergétique stimulée pharmacologiquement. Ensuite, la méthode a été appliquée à des rats soumis à la chimiothérapie à la doxorubicine pour induire l'insuffisance cardiaque. L'effet de la doxorubicine sur la perfusion et la consommation en oxygène du myocarde a été mesuré au repos et sous stimulation pharmacologique de dobutamine, afin d'obtenir la capacité de réserve lors d'une demande d'énergie importante.

Résultats : La validation du protocole a démontré une bonne corrélation entre la MPI et MVO_2 ($r^2 = 0,68$). La réserve de perfusion cardiaque du groupe traité à la doxorubicine était significativement diminuée (traités $1,31 \pm 0,17$ vs contrôle $1,59 \pm 0,25$; $p = 0,04$). Des résultats similaires ont été obtenus pour la réserve de la consommation d'oxygène du myocarde (traités $1,79 \pm 0,43$ vs contrôle $2,34 \pm 0,25$; $p = 0,02$).

Conclusion : Le protocole repos/effort avec le ^{11}C -acétate est une méthode robuste et rapide pour évaluer les réserves de perfusion et de consommation d'oxygène du myocarde. Il est en mesure de diagnostiquer l'insuffisance cardiaque induite par la doxorubicine chez le rat et offre des possibilités d'application dans plusieurs désordres cardiaques.

Chapitre 4.2. Texte de l'article

[¹¹C]ACETATE REST-STRESS PROTOCOL TO ASSESS MYOCARDIAL PERFUSION AND OXYGEN CONSUMPTION RESERVE IN A MODEL OF CONGESTIVE HEART FAILURE IN RATS

ORIGINAL ARTICLE

ABBREVIATED TITLE: [¹¹C]acetate assessment of congestive heart failure in rats.

Authors : Etienne Croteau¹, M.Sc., Suzanne Gascon¹, B.Sc., M'hamed Bentourkia¹, Ph.D., Réjean Langlois¹, M.Sc., Jacques A. Rousseau¹, Ph.D., Roger Lecomte¹, Ph.D., François Bénard², M.D.

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, and Sherbrooke Molecular Imaging Center, Étienne-LeBel Clinical Research Center, CHUS, Québec, Canada.

²Division of Nuclear Medicine, Department of Radiology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Author for correspondence and reprints:

Current Address:

Dr. François Bénard

BC Cancer Agency Research Centre

675 West 10th Avenue

Vancouver, BC V5Z 1L3

Tel. (604) 675-8206

Fax (604) 877-6245

E-mail : fbenard@bccrc.ca

First author:

Etienne Croteau

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology

Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Tel. (819) 346-1110 ext. 11868 Fax (819) 829-3238

E-mail: etienne.croteau@usherbrooke.ca

Keywords: [¹¹C]Acetate, Cardiovascular Reserve, Myocardial Perfusion, Myocardial Oxygen Consumption, Rest/Stress Study, Small Animal PET Imaging, Dobutamine, Congestive Heart failure.

Abstract

This study describes an [^{11}C]acetate rest/stress method to obtain an indirect estimate of myocardial blood flow (MBF) and myocardial oxygen consumption (MVO_2) in rats. Doxorubicin cardiotoxicity was used to test the usefulness of this approach for the assessment of congestive heart failure. **Methods:** The method was first validated in healthy rats over a broad range of cardiac workload and then applied to rats receiving doxorubicin chemotherapy to induce myocardial dysfunction. The effect of doxorubicin on myocardial perfusion and oxygen consumption reserve was also measured at rest and under dobutamine stimulation. **Results:** Validation of the protocol showed a good correlation between the MBF and MVO_2 ($r^2 = 0.68$). The doxorubicin treated group showed a significant ($p=0.04$) decrease in cardiovascular perfusion reserve at 1.3 ± 0.2 compared to the control animals at 1.8 ± 0.4 . Similar results were obtained for the myocardial oxygen consumption reserve (treated 1.6 ± 0.2 vs controls 2.3 ± 0.3 ; $p=0.02$). **Conclusions:** The [^{11}C]acetate rest/stress protocol is a rapid and reliable method to assess myocardial perfusion reserve and oxygen consumption with potential applications in various cardiac disorders.

Introduction

To sustain its contractile function, the healthy heart relies mainly on the aerobic oxidation of fatty acid substrates via the tricarboxylic acid cycle (TCA). However when the energy supply is modified by diet, exercise, stress or other factors, myocardial cells can modulate their metabolic activity, or favor alternative sources of energy such as glucose, amino acids or ketone bodies.

Due to the important role of acetate in energy metabolism, [^{11}C]acetate can be useful to explore myocardial metabolism [1-8]. When used with the proper kinetic models, [^{11}C]acetate PET imaging has the advantage of providing information on both myocardial blood flow (MBF) and myocardial oxygen consumption (MVO_2) simultaneously. In myocytes, [^{11}C]acetate enters the tricarboxylic cycle (TCA) where it is metabolized into acetyl-coA (beta-oxidation) yielding [^{11}C]CO₂, a process requiring the presence of NADH H⁺ and FADH₂ from TCA and leading to the production of ATP, which is the primary source of energy necessary for heart contraction [7-9]. Since the clearance rate of [^{11}C]acetate and its metabolites are correlated with oxygen consumption independently of the substrate type or of the physiological state of the subject [10,11], [^{11}C]acetate can be used to indirectly estimate myocardial MVO_2 .

This powerful method can have important clinical implications for the assessment of heart failure pathophysiology. One such application would be in the monitoring of cardiotoxicity induced as a result of cancer therapy. Doxorubicin chemotherapy is known to induce a decrease in mitochondrial oxidative phosphorylation [12]. By providing an index of myocardial blood

flow and oxidative metabolism, [^{11}C]acetate can therefore be used to detect changes linked to pathophysiology of the myocardial dysfunction by monitoring oxygen consumption and concomitant changes in myocardial perfusion.

In this article, we first confirmed the validity of [^{11}C]acetate rest/stress PET imaging protocol in conjunction with a three compartment kinetic model to measure MBF, MVO_2 and cardiac reserve in a rat model. We then applied this approach in a model of congestive heart failure induced by doxorubicin cardiotoxicity.

Materials and Methods

Animal model

The animal experiments were conducted in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and of the in-house Ethics Committee for Animal Experiments. The [^{11}C]acetate rest/stress PET protocol was validated in a group of nine male Sprague-Dawley rats (Validation group) (Charles River) weighing 370 ± 30 grams. Five of these rats received dobutamine to increase their cardiac work and four rats received the beta-blocker metoprolol. Metoprolol is a negative chronotropic agent that decrease cardiac work and was selected to increase the range of cardiac workload values. The application of the method to the assessment of doxorubicin cardiotoxicity was performed in a group of Fischer rats, weighing 235 ± 28 grams. Six rats received doxorubicin weekly, for six weeks (i.v. 2 mg/kg) (Doxorubicin group) before being imaged [13] while the six other rats were treatment free (Control group) weighing 230 ± 20 grams. The decrease in left ventricular ejection fraction, as measured from the cardiac gated [^{11}C]acetate image, was used as an index of doxorobucin induced myocardial dysfunction [12].

PET imaging

Isoflurane anesthesia (1.5%, 1 L/min oxygen, Abbott Laboratories) was delivered through a nose cone, and two venous catheters were installed into the caudal veins, one for the injection of the pharmacological agent and the other for the administration of [^{11}C]acetate. In the validation group, the arterial blood pressure and heart rate were monitored throughout the

experiment with a pressure analyzer (Blood Pressure Analyzer 400, Micro-Med Inc.) connected to a membrane probe transducer attached to a PE50 polyethylene catheter (Becton Dickinson) inserted into the femoral artery. Two of the systolic pressure measurements could not be completed due to technical problems. For all groups, the body temperature, respiration and heart rates were monitored using external probes, and recorded for the entire duration of the experiment (SA Instruments Inc., NY, USA).

The validation of the protocol was done in healthy rats on the Sherbrooke Small Animal PET Scanner [14] capable of achieving an in-plane resolution of 2.1 mm. The application of the protocol to the assessment of doxorubicin cardiotoxicity was performed on a LabPET4 scanner [15,16] with a transaxial and axial field of view (FOV) of 11 cm and 3.75 cm, respectively, and a nearly isotropic resolution of 1.35 mm. The LabPET4 scanner was used in these latter experiments as it replaced the older Sherbrooke small animal PET scanner. A new control group was thus measured using the LabPET4 scanner to ensure that technical differences between the two scanners would not affect the data.

Rest/stress protocol

For the validation study, a 10-min PET list mode was used with an intravenous (i.v.) administration of 90 ± 10 MBq of [^{11}C]acetate. The pharmacological stress was induced using dobutamine (Novopharm) or metoprolol (Novartis Pharma). Following the completion of the rest list-mode acquisition, dobutamine administration was performed with three stepwise increases in the infusion rate (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ for 2 min, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ for 2 min and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ for 9 min). The second injection of [^{11}C]acetate (90 ± 10 MBq) was initiated 5 minutes before the end of the

dobutamine infusion and the stress dynamic PET imaging data were acquired for 10 minutes thereafter. Metoprolol stimulation was achieved by a constant infusion, 0.2 mg/kg over 10 minutes with the second injection of [^{11}C]acetate for PET imaging occurring after 5 minutes from the beginning of the administration of the pharmacological agent.

For the doxorubicin study (on the LabPET4 scanner), the control and doxorubicin groups had each a 20-min list mode acquisition for the rest and stress conditions with a 10 minutes interval between the two scans.

Image derived input function (IDIF) and myocardium correction

The rest-stress protocol requires the administration of two consecutive injections of [^{11}C]acetate to the same rat, separated by a time interval of at least 20 minutes. Therefore, some residual radioactivity from the first injection still remained in the animal when the second dose of [^{11}C]acetate was injected (see Fig. 1a). The residual radioactivity was subtracted from the second [^{11}C]acetate injection by extrapolating the time activity curve (TAC) from the first [^{11}C]acetate injection. Correction for partial volume and spill-in effects were performed using the left ventricular blood volume coefficient [17]. The coefficients were evaluated by imaging a cylindrical phantom filled with water and containing spheres of different sizes (2.9, 4.5, 5.6, 6.9, 9.5, 13.1 and 17.4 mm diameter). For the assessment of spill in, the cylinder was filled with water containing radioactivity, while the spheres were cold. For the determination of partial volume, the spheres contained radioactivity while the cylinder was filled with plain water. Fig. 1b shows typical blood and myocardial time-activity curves corrected for these effects.

Figure 1

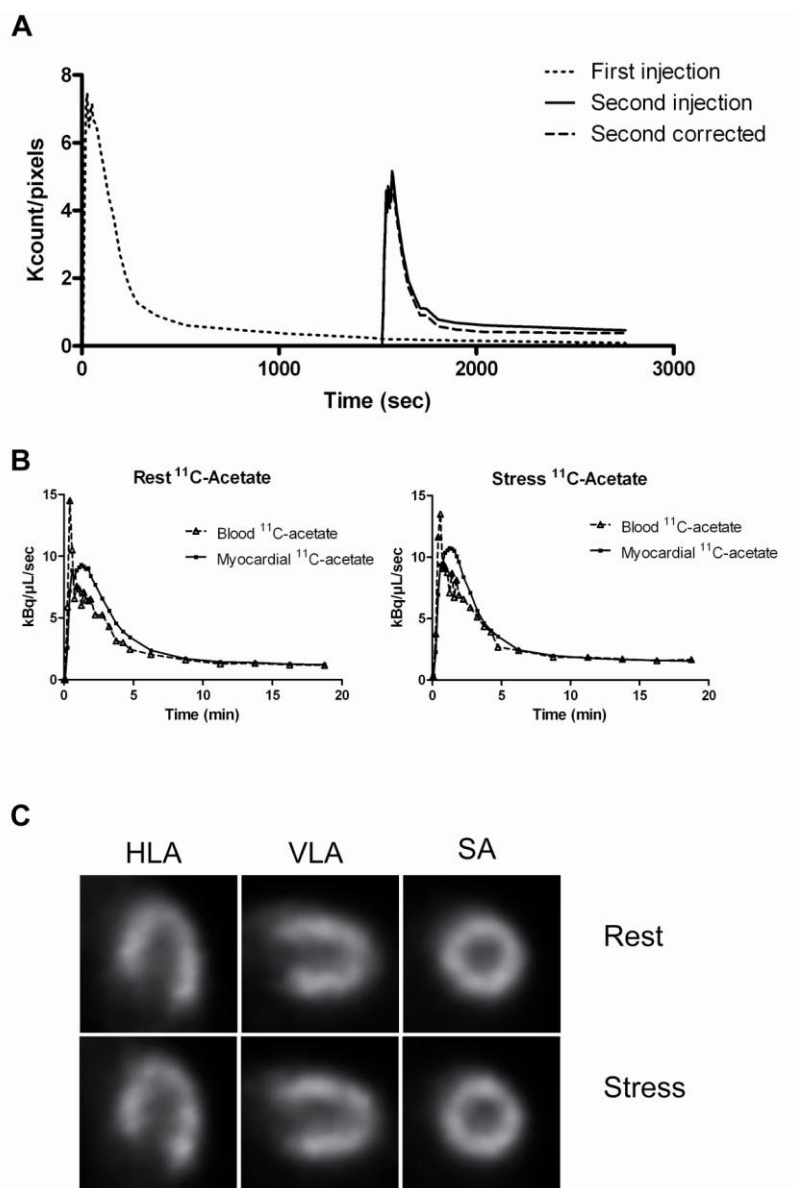


Fig. 1: (a) Correction of the second $[^{11}\text{C}]$ acetate injection for the residual radioactivity from the first injection. The correction was made by subtracting the remaining extrapolated radioactivity of the first $[^{11}\text{C}]$ acetate injection from that of the second injection using a compartmental model. (b) $[^{11}\text{C}]$ acetate tissue and blood time activity curves at rest (left) and under dobutamine induced stress (right). (c) Heart images of a Fisher male rat (197 grams) treated with doxorubicin (2 mg/kg/week), for 6 weeks, following i.v. administration of $[^{11}\text{C}]$ acetate under rest (105 MBq) or dobutamine stimulation (107 MBq). The images were constructed from the 60 to 180 sec time interval of a dynamic study. Horizontal long axis (HLA), Vertical long axis (VLA) and short axis (SA) images for the rest and stress conditions are shown.

Data Analysis

For the validation protocol, a dynamic series of 22 frames was sorted out from the list-mode data, using the following sequence: 12×5 sec, 8×30 sec, 2×150 sec and the images reconstructed using the maximum likelihood expectation maximization (ML-EM) algorithm [18]. Tissue time-activity curves were then generated from a region of interest (ROI) drawn manually on the myocardium in the summed frames of the interval from 1 to 3 minutes and then copied to all frames of the rest/stress image series. The input blood curve was obtained from a ROI drawn on the left ventricular cavity (Fig. 1c). For the doxorubicin study, we selected a time series of 12×10 sec, 6×30 sec and 6×150 sec for the analysis and the images reconstructed using ML-EM algorithm. A three-compartment kinetic model was used for the computation of blood flow and myocardial oxygen consumption using the following equations [19,20]:

$$C_t(t) = [A_1 \cdot \exp(-(k_2 + k_3)t) + A_2 \cdot \exp(-k_4 t)] \otimes C_p(t) + v \cdot C_{tot}(t)$$

$$A_1 = K_1 k_2 / (k_2 + k_3)$$

$$A_2 = K_1 k_3 / (k_2 + k_3)$$

where C_t , C_p and C_{tot} are the tissue, plasma and total arterial time-activity curves, K_1 to k_4 are the rate constants and v is the blood volume. K_1 is related to myocardial blood flow, while k_2 is an index of MVO_2 . The activity due to metabolites in the plasma was estimated as:

$$C_p(t) = [1 - a_0 \cdot (1 - \exp(-t \cdot \log 2 / m))] \cdot C_{tot}(t)$$

where a_0 and m are parameters to be fitted for the presence of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ in the blood.

Left ventricular ejection fraction

For the control and doxorubicin groups, the list mode [^{11}C]acetate PET data acquired with cardiac gating were analyzed in the interval from 60 to 240 sec with a sequence of eight electrocardiogram (ECG)-gated frames, selected on the basis of the R-R intervals, to extract the left ventricular volumes and ejection fraction. The Corridor4DM software from Segami Oasis (Columbia, MD, USA) was used for reorientation and cardiac data analysis.

Correlation of the index of myocardial oxygen consumption

Among the various parameters that have been proposed to measure the oxygen demand in healthy subjects [8], the heart rate-pressure product (RPP) (heart rate \times systolic pressure) is recognized to be a good index of MVO_2 [8,21-23]. In the validation experiment, we were able to calculate the RPP using the heart rate and the measurements of the systolic pressure obtained with the arterial pressure analyzer. This value was correlated with the MVO_2 derived from the [^{11}C]acetate measurements.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). For the validation study, the determination coefficients (r^2) were used to evaluate the strength of the relationship between the MVO_2 and MBF and the MVO_2 and RPP difference. The results from the rest and pharmacological intervention measurements were compared using a two tail paired Student t -test. The changes induced by pharmacological intervention were calculated as follow: $1 - (\text{R}/\text{S}) \times 100$, where R represents the rest (baseline) and S the stimulated (dobutamine or metoprolol)

values. The individual values from each animal were averaged and the data were reported as mean \pm standard deviation (SD). For the doxorubicin model, the rest/stress were compared using a two tail paired Student *t*-test in both groups. To compare the myocardial perfusion and myocardial oxygen consumption reserve, a two tail unpaired Student *t*-test was used. Statistical analyses were performed with the PRISM 5.0 software package (GraphPad Software). A probability value equal to or less than 0.05 was considered significant.

Results

Myocardial perfusion reserve is a potentially useful indicator of cardiac health status. When derived from [^{11}C]acetate PET imaging, indirect estimates of myocardial perfusion, myocardial oxygen consumption and cardiac reserve are obtained. Our first step was to validate this approach in healthy rats. We then evaluated its potential application for the measurement of congestive heart failure induced by doxorubicin treatment.

Validation of the rest/stress protocol in healthy rats

All pharmacological interventions induced a significant change (paired Student t-test $p < .05$) in MBF (K_1) and MVO_2 (k_2) (Fig. 2). The administration of the beta-blocker metoprolol (N=4) reduced myocardial blood flow ($26.3 \pm 14.0\%$), oxygen consumption ($13.2 \pm 3.7\%$) and heart rate ($11.9 \pm 9.7\%$). On the other hand, the inotropic and the chronotropic positive effect brought about by dobutamine (N=5) increased the myocardial blood flow ($60.8 \pm 69.5\%$), oxygen consumption ($107.2\% \pm 90.3\%$) and heart rate ($16.3\% \pm 10.6\%$).

Figure 2

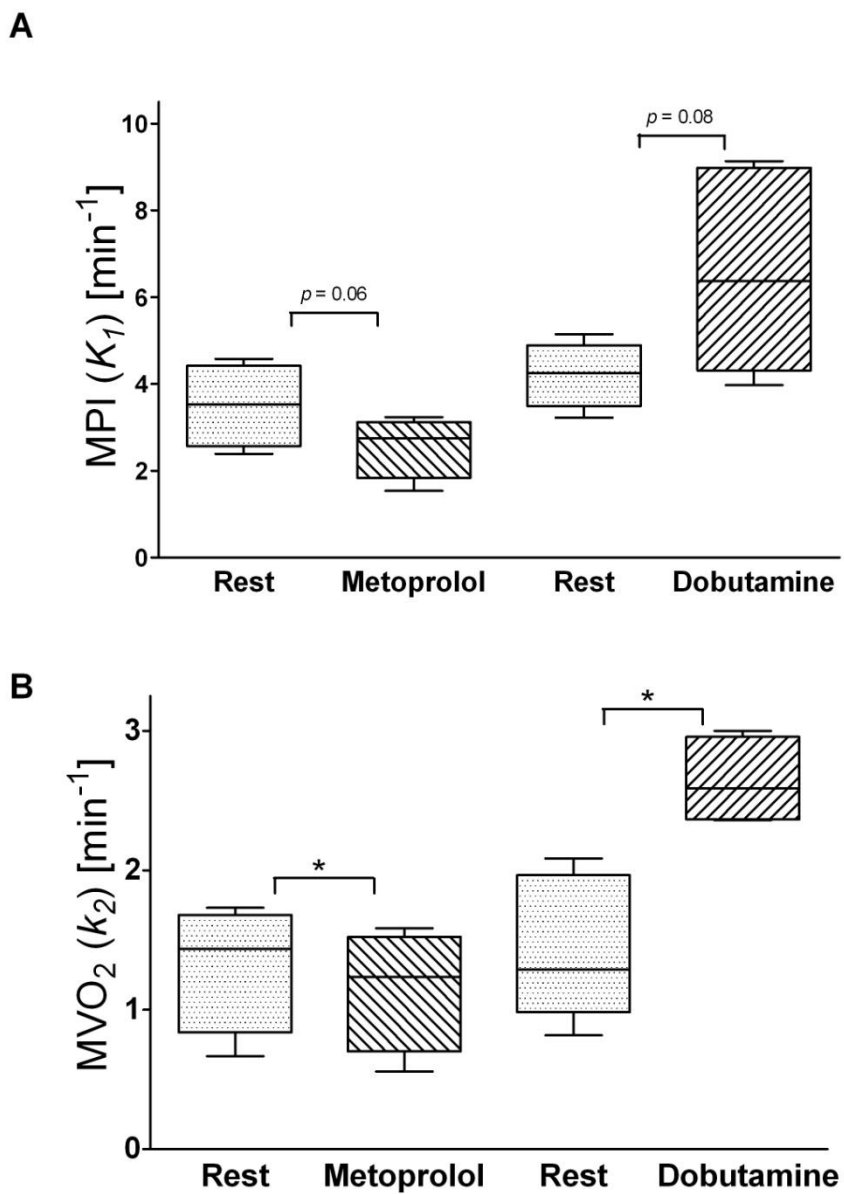


Fig. 2: Box and Whisker Plot of the myocardial perfusion (a) and myocardial oxygen consumption (b) in the validation of the healthy rat group. Metoprolol (N=4), Dobutamine (N=5). *Paired two tail Student t -test, $p < .05$ for rest vs. pharmacological intervention.

Furthermore, both the beta-blocker and dobutamine were found to slightly decrease the systemic blood pressure by $12.3 \pm 11.0\%$ and $9.9 \pm 2.5\%$, respectively (Table 1). In this rat model, we found that the relationship between MVO_2 and RPP remained true over the wide range of cardiac workloads ($r^2 = 0.60$) (Fig. 3). The RPP values decreased from the Rest values with beta-blocker ($-24.0 \pm 13.5\%$) and slightly increased above Rest values during stress ($+6.3 \pm 4.7\%$).

Table 1

Hemodynamics and kinetics of rest/stress [^{14}C]acetate protocol validation

Control group (N = 9)	Rest	Beta-Blocker (N=4)		Rest	Stress (N=5)	
MPI (K_1) (min^{-1})	3.5 ± 1.0	2.6 ± 0.7	$p=0.06$	4.2 ± 0.7	6.6 ± 2.4	$p=0.08$
MVO_2 (k_2) (min^{-1})	1.3 ± 0.5	1.2 ± 0.4	*	1.4 ± 0.5	2.6 ± 0.3	*
Heart Rate (BPM)	304 ± 47	265 ± 23	$p=0.12$	299 ± 42	345 ± 29	*
Systolic pressure (mm Hg)	86 ± 23	80 ± 6	(N=3)	94 ± 13	89 ± 13	* (N=4)
Diastolic pressure (mm Hg)	64 ± 18	61 ± 14	(N=3)	68 ± 10	60 ± 10	* (N=4)
Mean pressure (mm Hg)	78 ± 3	67 ± 9	$p=0.12$	78 ± 8	70 ± 7	* (N=4)
RPP [†]	23576 ± 2541	16463 ± 2648	(N=3)	29722 ± 4906	31531 ± 4887	$p=0.08$ (N=4)

* Paired 2-tailed *t* test, rest vs. pharmacological intervention, $p < 0.05$.

† RPP: rate pressure product.

Figure 3

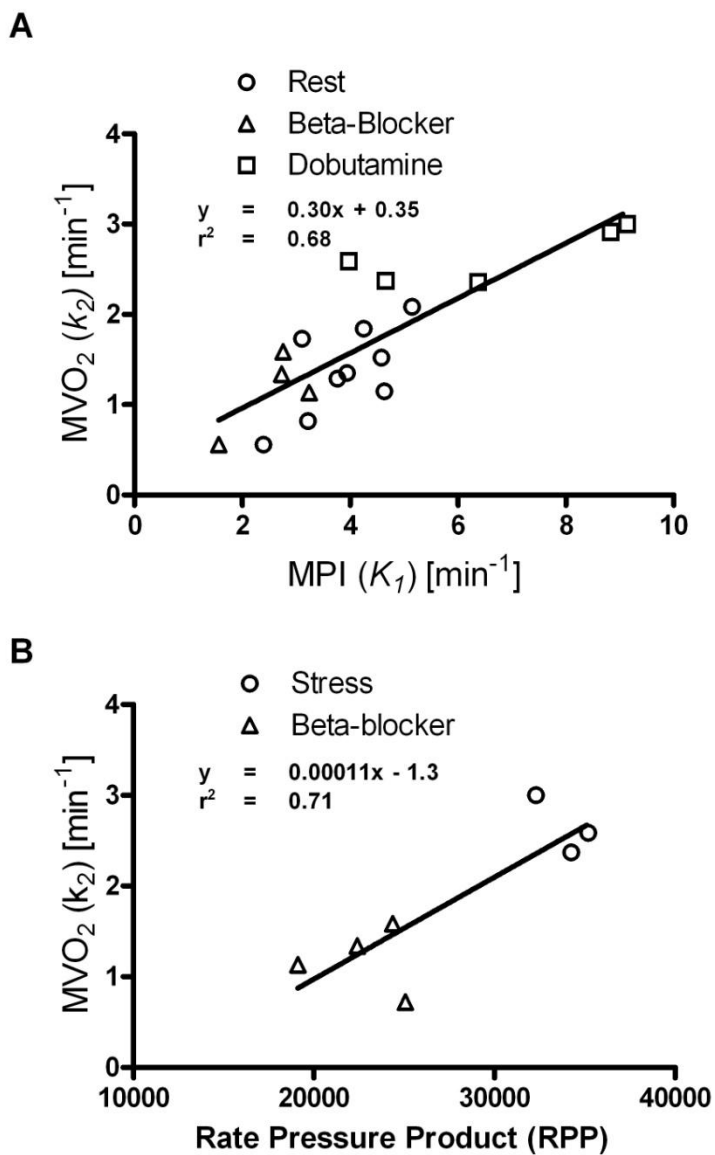


Fig. 3: (a) Correlation between the indirect estimate of myocardial blood flow (MBF) and myocardial oxygen consumption (MVO₂). (b) Correlation between the indirect estimate of myocardial oxygen consumption (MVO₂) and the rate pressure product (RPP) difference for negative (Beta-blocker) and positive (Dobutamine) pharmacological stimulation.

Assessment of cardiotoxicity in the doxorubicin group

Several detrimental effects of doxorubicin on the heart function integrity were highlighted under pharmacological stress. The weekly treatments of doxorubicin (N=6), resulted in a trend towards a reduction in MVO_2 (k_2) (1.6 ± 0.2 vs 2.3 ± 0.3 for controls, $p=0.06$) under dobutamine stimulation. The perfusion reserve (1.3 ± 0.2 vs 1.8 ± 0.4 for controls, $p=0.04$) and oxygen consumption reserve (1.6 ± 0.2 vs 2.3 ± 0.3 for controls, $p=0.02$, unpaired t -test) were significantly altered (Fig. 4 and Table 2). Similarly, as expected, the left ventricular ejection fraction at baseline was diminished ($38.3 \pm 4.9\%$ vs $58.6 \pm 5.4\%$ for controls).

Table 2

MPI, MVO_2 and myocardial reserve for the Treated and Control groups

		Control (N=6)	Treated* (N=6)	p value [†]
MPI (K_1)	Rest (min^{-1})	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.5	0.83
	Stress (min^{-1})	5.3 ± 1.4	4.3 ± 1.1	0.28
MVO_2 (k_2)	Rest (min^{-1})	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.55
	Stress (min^{-1})	2.4 ± 0.4	1.6 ± 0.5	0.06
MPI reserve ^{††}		1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.04
MVO_2 reserve ^{††}		2.3 ± 0.3	1.8 ± 0.4	0.02

* Weekly treatment (2 mg/kg i.v. doxorubicin) for 6 weeks.

[†] Unpaired 2-tailed t test, control vs. treated groups.

^{††} Reserve was calculated as the ratio of Stress to Rest condition.

Figure 4

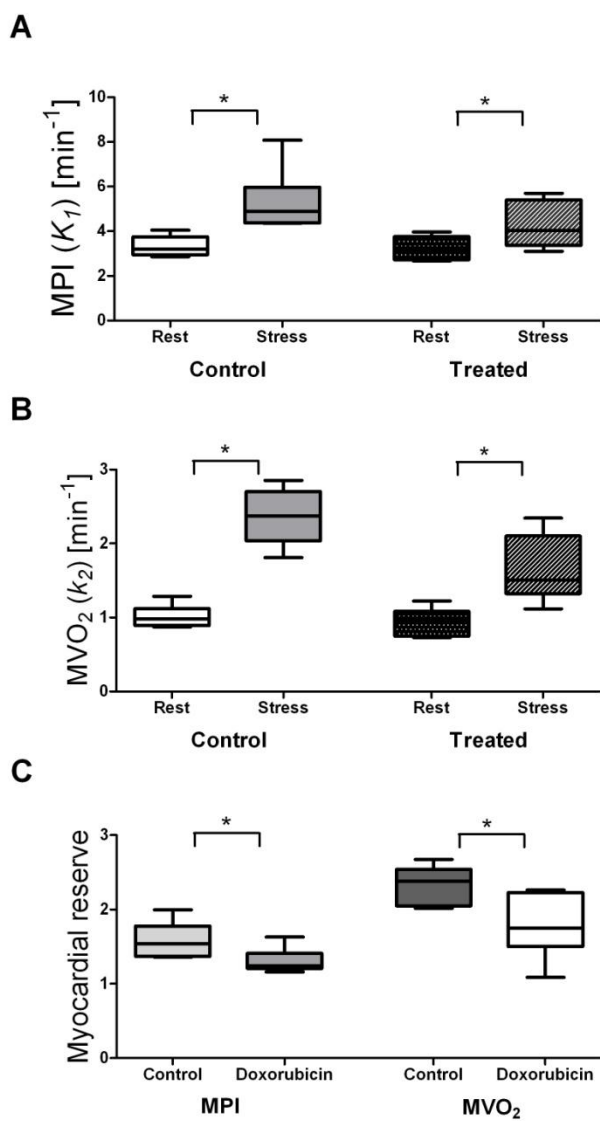


Fig. 4: Box and Whisker Plot in the doxorubicin group (2 mg/kg for 6 weeks) (N=6), compared to the control (N=6) rat heart. (a) Myocardial blood flow, (b) myocardial oxygen consumption and (c) cardiac reserve. *Paired two tail Student *t*-test, $p < .05$ for rest vs. pharmacological intervention and unpaired two tail Student *t*-test, $p < .05$ for cardiac reserve doxorubicin group vs. control.

Discussion

In this paper we describe a rest/stress [^{11}C]acetate PET imaging protocol that can effectively yield measurement of the myocardial blood flow [3,4,6,24-26], oxygen consumption [2,8,10,11,19,24,25,27] and cardiac reserve across many different conditions in the rat. This protocol can be applied to the assessment of congestive heart failure induced by doxorubicin. Because they are non invasive, [^{11}C]acetate imaging studies are well suited to perform test-retest experiments in the same subject. With the advent of high resolution small animal PET scanners, this rest/stress technique has the potential to become an important tool in the evaluation of cardiomyopathy and for the development of new cardioprotective drugs. Furthermore, the strength of the method was demonstrated over a wide range of cardiac workload to validate its suitability for the measurement of congestive heart failure.

PET imaging with [^{11}C]acetate in the rat is challenging because of the short cardiac transit time of [^{11}C]acetate [24] and the rapid heart rate (300 ± 42 BPM) of the rat compared to other animal models such as the dog (122 ± 51 BPM) [11] or to experiments conducted in human subjects (75 ± 14 BPM) [22]. The best target/background ratio in the rat myocardium was reached between the first and third minutes after administration of the radiotracer. Therefore, for kinetic modeling, the use of list mode data acquisition was an important asset to allow a proper selection of time frames over such a short time interval [28]. Despite the small size of the rat heart and ventricular cavity, the high quality images that were obtained using the Sherbrooke Small Animal PET and the LabPET4 scanners made it possible to draw accurate ROI for extracting the tissue and blood input curves in both the rest and stress studies.

In order to assess the potential of [^{11}C]acetate over a wide range of cardiac workload, we used metoprolol to decrease the heart rate and dobutamine to increase it. Metoprolol, an antagonist of the β_1 receptor, is also used to antagonize the tachycardia induced by catecholamines, by decreasing the heart rate, contractility and mean blood pressure [29]. Dobutamine on the other hand, is an inotropic positive drug that increases the frequency and the strength of the contractions by acting on the β_1 -adrenergic receptors while at the same time causing a vasodilatation of the peripheral blood vessels via the β_2 receptors [30]. In this study, we chose to administer low doses of beta-blocker (0.2 mg/kg i.v.) and dobutamine (infused at a slower rate of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), unlike other experimental protocols which used up to 0.5 mg/kg [31] and 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ [30], respectively, in human studies. Although beyond the scope of the present work, it would be of interest to repeat these experiments at higher doses to extend the range of myocardial workload at which the perfusion and oxygen consumption can be measured with [^{11}C]acetate.

A 3-compartment model which takes into account the influence of the [^{11}C]acetate metabolites ([^{11}C]O₂) on the blood curve [19] was used to calculate MBF and the MVO₂. Since the heart was imaged with [^{11}C]acetate before the administration of the drug (rest) and again after the pharmacological intervention (stress), it was necessary to correct the data for residual radioactivity remaining from the first [^{11}C]acetate administration.

A longer delay allowing further physical decay and biological clearance of the residual activity before the second injection would have resulted in a longer period of anesthesia. It has been reported that anesthesia led to a decrease in the systemic blood pressure compared to the

values obtained with in conscious cats [32]. We believe that this effect is brought about by the use of isoflurane 1.5% while the animal is under spontaneous breathing conditions [33]. This unavoidable effect of anesthesia, which may affect the baseline values of MBF and MVO_2 , did not mask the effects of the the drugs used in this study with the observation of a significant impact of pharmacological action on MBF and MVO_2 values determined with [^{11}C]acetate.

The measurement of MBF and MVO_2 were highly correlated ($r^2 = 0.68$) and followed the heart rate and rate-pressure product over a wide range of cardiac workload (Fig. 3). The indirect estimates of the myocardial perfusion obtained in this work using the [^{11}C]acetate method were similar to those previously reported in the rat with [^{13}N]ammonia at 3.8 ± 0.9 mL/g/min (N=10) and with [^{11}C]acetate at 4.0 ± 0.8 mL/g/min (N=12) under similar isoflurane anesthesia [34].

The heart rate, the arterial blood pressure and the rate pressure product (RPP) index were used as reference values to assess the effect of pharmacological interventions. A close correlation was found between these physiological parameters and the MBF and MVO_2 values measured at rest as well as during adrenergic stimulation and inhibition, with the exception of the arterial blood pressure (Table 1). We noticed that either positive or negative stimulation of the beta-adrenergic receptor led to a decrease in mean systemic blood pressure, although with dobutamine, this effect did not reach statistical significance ($p = 0.08$). Nevertheless, the RPP, which is known to be well correlated with the oxygen consumption [23], was found to hold true even when the blood pressure was decreased through pharmacological manipulation. In the current study, we were therefore able to confirm the relationship between the RPP and myocardial oxygen consumption.

Chemotherapy treatment with doxorubicin is well known to have a detrimental impact on cardiac health. Overtime, doxorubicin induces a cardiomyopathy resulting from myocytes apoptosis [12,35]. The damage is linked to oxidative stress at the level of the mitochondria that will interfere with oxidative phosphorylation. The [^{11}C]acetate rest-stress protocol described here thus allowed us to directly and non-invasively monitor mitochondrial metabolism and at the same time to measure the myocardial perfusion reserve.

Conclusion:

The measurement of myocardial blood flow (MBF) and oxygen consumption (MVO_2) in the rat using [^{11}C]acetate was found to be sensitive and appropriate for the evaluation of myocardial perfusion. This method, although developed for human applications, can find several applications in small animal research, such as the evaluation of therapeutic angiogenesis promoting revascularization in ischemic tissues, the remodeling after a myocardial infarction, the inflammation in the coronary arteries or the assessment of cardioprotective drugs. The small animal PET imaging rest/stress protocol presented here makes it is possible to reliably measure myocardial perfusion and the rate of oxidative metabolism over a wide range of cardiac workload. This method was also found suitable for the measurement of the impact of doxorubicin chemotherapy on cardiac myocytes.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mélanie Archambault, Merajuddin Khan and the technical and cyclotron staff of the Sherbrooke Molecular Imaging Center for their assistance. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR - MOP53094 and PRG-80137), a postgraduate Scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and (FRSQ) Scholarships from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FB). The Etienne-Le Bel Clinical Research Center is an FRSQ-funded research center.

Conflict of Interest

The authors have declared relevant conflicts of interest.

References:

- [1] Lindhe O, Sun A, Ulin J, Rahman O, Langstrom B, Sorensen J. [¹⁸F]Fluoroacetate is not a functional analogue of [¹¹C]acetate in normal physiology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36(9):1453-9.
- [2] Knuuti J, Sundell J, Naum A, Engblom E, Koistinen J, Ylitalo A, Stolen KQ, Kalliokoski R, Nekolla SG, Bax KE, Airaksinen KE. Assessment of right ventricular oxidative metabolism by PET in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing cardiac resynchronization therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31(12):1592-8.
- [3] Gregory SA, MacRae CA, Aziz K, Sims KB, Schmahmann JD, Kardan A, Morss AM, Ellinor PT, Tawakol A, Fischman AJ, Gewirtz H. Myocardial blood flow and oxygen consumption in patients with Friedreich's ataxia prior to the onset of cardiomyopathy. *Coron Artery Dis* 2007;18(1):15-22.
- [4] Lindner O, Vogt J, Baller D, Kammeier A, Wielepp P, Holzinger J, Lamp B, Horstkotte D, Burchert W. Global and regional myocardial oxygen consumption and blood flow in severe cardiomyopathy with left bundle branch block. *Eur J Heart Fail* 2005;7(2):225-30.
- [5] Juillard L, Lemoine S, Janier MF, Barthez PY, Bonnefoi F, Laville M. Validation of renal oxidative metabolism measurement by positron-emission tomography. *Hypertension* 2007;50(1):242-7.
- [6] Herrero P, Kim J, Sharp TL, Engelbach JA, Lewis JS, Gropler RJ, Welch MJ. Assessment of myocardial blood flow using ¹⁵O-water and 1-¹¹C-acetate in rats with small-animal PET. *J Nucl Med* 2006;47(3):477-85.
- [7] Ziegler A, Zaugg CE, Buser PT, Seelig J, Kunnecke B. Non-invasive measurements of myocardial carbon metabolism using in vivo ¹³C NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2002;15(3):222-34.
- [8] Klein LJ, Visser FC, Knaapen P, Peters JH, Teule GJ, Visser CA, Lammertsma AA. Carbon-11 acetate as a tracer of myocardial oxygen consumption. *Eur J Nucl Med* 2001;28(5):651-68.

- [9] Taegtmeier H, Goodwin GW, Doenst T, Frazier OH. Substrate metabolism as a determinant for postischemic functional recovery of the heart. *Am J Cardiol* 1997;80(3A):3A-10A.
- [10] Brown MA, Myears DW, Bergmann SR. Validity of estimates of myocardial oxidative metabolism with carbon-11 acetate and positron emission tomography despite altered patterns of substrate utilization. *J Nucl Med* 1989;30(2):187-93.
- [11] Brown MA, Myears DW, Bergmann SR. Noninvasive assessment of canine myocardial oxidative metabolism with carbon-11 acetate and positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 1988;12(4):1054-63.
- [12] Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* 2003;93(3):105-15.
- [13] Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, Wallace KB. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;200(2):159-68.
- [14] Lecomte R, Cadorette J, Rodrigue S, Lapointe D, Rouleau D, Bentourkia M, Yao R, Msaki P. Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *IEEE Trans Nucl Sci* 1996;43(3):1952-7.
- [15] Bergeron M, Cadorette J, Beaudoin J, Lepage MD, Robert G, Selivanov V, Tetrault M, Viscogliosi N, Norenberg JP, Fontaine R, Lecomte R. Performance Evaluation of the LabPET APD-Based Digital PET Scanner. *IEEE Trans Nucl Sci* 2009;56(1):10-6.
- [16] Bergeron M, Cadorette J, Bureau-Oxton C, Beaudoin J-, Tetrault M-, Leroux J-, Lepage MD, Robert G, Fontaine R, Lecomte R. Performance evaluation of the LabPET12, a large axial FOV APD-based digital PET scanner. *Nuclear Science Symposium Conference Record (NSS/MIC)*, 2009 IEEE 2009:4017-21.
- [17] Croteau E, Lavallee E, Labbe SM, Hubert L, Pifferi F, Rousseau JA, Cunnane SC, Carpentier AC, Lecomte R, Benard F. Image-derived input function in dynamic human PET/CT:

methodology and validation with ^{11}C -acetate and ^{18}F -fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ^{18}F -fluorodeoxyglucose in brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37(8):1539-1550.

[18] Selivanov VV, Lapointe D, Bentourkia M, Lecomte R. Cross-validation stopping rule for ML-EM reconstruction of dynamic PET series: effect on image quality and quantitative accuracy. *IEEE Trans Nucl Sci* 2001;48(3):883-9.

[19] Buck A, Wolpers HG, Hutchins GD, Savas V, Mangner TJ, Nguyen N, Schwaiger M. Effect of carbon-11-acetate recirculation on estimates of myocardial oxygen consumption by PET. [see comment]. *J Nucl Med* 1991;32(10):1950-7.

[20] Bentourkia M, Croteau E, Langlois R, Aliaga A, Cadorette J, Benard F, Lesur O, Lecomte R. Cardiac studies in rats with ^{11}C -acetate and PET: a comparison with ^{13}N -ammonia. *IEEE Trans Nucl Sci* 2002;49(5):2322-7.

[21] Henes CG, Bergmann SR, Walsh MN, Sobel BE, Geltman EM. Assessment of myocardial oxidative metabolic reserve with positron emission tomography and carbon-11 acetate. *J Nucl Med* 1989;30(9):1489-99.

[22] Bengel FM, Permanetter B, Ungerer M, Nekolla S, Schwaiger M. Non-invasive estimation of myocardial efficiency using positron emission tomography and carbon-11 acetate-- comparison between the normal and failing human heart. *Eur J Nucl Med* 2000;27(3):319-26.

[23] Nelson RR, Gobel FL, Jorgensen CR, Wang K, Wang Y, Taylor HL. Hemodynamic predictors of myocardial oxygen consumption during static and dynamic exercise. *Circulation* 1974;50(6):1179-89.

[24] Sun KT, Yeatman LA, Buxton DB, Chen K, Johnson JA, Huang SC, Kofoed KF, Weismueller S, Czernin J, Phelps ME, Schelbert HR. Simultaneous measurement of myocardial oxygen consumption and blood flow using [1-carbon-11]acetate. *J Nucl Med* 1998;39(2):272-80.

[25] Porenta G, Cherry S, Czernin J, Brunken R, Kuhle W, Hashimoto T, Schelbert HR. Noninvasive determination of myocardial blood flow, oxygen consumption and efficiency in

normal humans by carbon-11 acetate positron emission tomography imaging. *Eur J Nucl Med* 1999;26(11):1465-74.

[26] Gropler RJ, Siegel BA, Geltman EM. Myocardial uptake of carbon-11-acetate as an indirect estimate of regional myocardial blood flow. *J Nucl Med* 1991;32(2):245-51.

[27] Lindner O, Sorensen J, Vogt J, Fricke E, Baller D, Horstkotte D, Burchert W. Cardiac efficiency and oxygen consumption measured with ¹¹C-acetate PET after long-term cardiac resynchronization therapy. *J Nucl Med* 2006;47(3):378-83.

[28] Lepage MD, Cadorette J, Leger G, Leroux JD, Otis M, Lecomte R. High-speed PC-based list-mode data acquisition system for the Sherbrooke animal PET scanner. *J Nucl Med* 2001;42(5):204p.

[29] Billinger M, Raeber L, Seiler C, Windecker S, Meier B, Hess OM. Coronary collateral perfusion in patients with coronary artery disease: effect of metoprolol.[see comment]. *Eur Heart J* 2004;25(7):565-70.

[30] Sakanashi M, Tomomatsu E, Takeo S, Araki H, Iwasaki K, Sakamoto K, Takenaka F. Effects of dobutamine on coronary circulation and cardiac metabolism of the dog. *Arzneimittelforschung* 1978;28(5):798-801.

[31] Ablad B, Borg KO, Carlsson E, Ek L, Johnson G, Malmfors T, Regardh CG. A survey of the pharmacological properties of metoprolol in animals and man. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1975;36(Suppl 5):7-23.

[32] Hodgson DS, Dunlop CI, Chapman PL, Grandy JL. Cardiopulmonary effects of anesthesia induced and maintained with isoflurane in cats. *Am J Vet Res* 1998;59(2):182-5.

[33] Fizanne L, Fromy B, Preckel MP, Sigaudou-Roussel D, Saumet JL. Effect of isoflurane on skin-pressure-induced vasodilation. *J Vasc Res* 2003-Aug;40(4):416-22.

[34] Croteau E, Benard F, Bentourkia M, Rousseau J, Paquette M, Lecomte R. Quantitative myocardial perfusion and coronary reserve in rats with ¹³N-ammonia and small animal PET: impact of anesthesia and pharmacologic stress agents. *J Nucl Med* 2004;45(11):1924-30.

[35] Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, Kashiwaya Y, Hasko G, Liaudet L, Szabo C, Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296(5):H1466-83.

Chapitre 4.3. Réponses (en anglais) aux questions de l'évaluateur externe concernant l'article (3)

(Comments from external reviewer not addressed in text revision)

1. The dynamic sequence appeared to change for the doxorubicin model. It is unclear why this was changed (if I interpreted the data analysis section correctly).

We did not use the same dynamic sequence for the validation experiment and the doxorubicin treatment experiment. The reason for this is that while doing this project, we acquired a better PET scanner. Thus, we decided to pursue the experiments on this new scanner. This should not affect the overall results as each experiment had its own control group that was scanned on the same scanner.

2. The validation of C-11-acetate vs. rate pressure product is well presented. The candidate also demonstrates a relationship to myocardial flow. It would be interesting to know whether this relationship is altered in the doxorubicin heart failure model.

Heart failure is often linked to ventricular hypertrophy, fibrosis, stiffness and reduction in mechanical efficiency. A dobutamine protocol has previously been used in a group of patient with heart failure symptoms (*J Am Coll Cardiol* 2004;43:1027–33) and shown to be correlated. MVO_2 and MBF were indirectly measured with ^{11}C -acetate and ^{15}O -H₂O respectively. Unfortunately, we did not perform invasive blood pressure measurements in our experiments. Rather, we put the emphasis on a rest/stress protocol which was considered more appropriate for follow-up studies. The doxorubicin protocol will ultimately lead to apoptotic cell death creating fibrosis and stiffness; further investigation will indeed be useful to validate the relationship between MBF, MVO_2 and RPP in rat heart failure models.

3. The candidate presents the ejection fraction, which shows evidence of ventricular dysfunction but this does not mean that the rats had heart failure, per se. Some data on the appearance of the rats, whether they developed ascites, pilo-erection or other signs of heart failure would be helpful. The mortality rate should be reported.

There was no mortality associated with the weekly treatment of 2 mg/kg i.v. which was used in the present study, but 25% mortality was reported for a weekly protocol using 2.5 mg/kg i.p. for 6 weeks (Life Sci 1999;65:1265-74) with a significant volume of ascites (14.4 ± 4.9 ml). In our protocol, the treated animals did not gain weight, comparatively to the control rats which on the average increased their weight by 10g/w during the same period. The heart weight was proportional to the body weight; both groups presented equivalent heart to body weight ratio values. These observations are good indicators of the disease but they were not undeniable proof, and they cannot replace pathological examination of the heart muscle and this could be a limitation in this study. For future studies, it is recommended to include echocardiography measurements. This would be helpful for the evaluation of the presence of ascites and would yield heart images, pathology evaluation should also be considered.

4. Previous works evaluating dobutamine, metoprolol and metabolic reserve should also be cited.

The following text was inserted in the introduction: "This promising method has already been used with success in clinical research for the assessment of ischemia, viability studies, dilated (non-ischemic) cardiomyopathy, aortic stenosis and heart transplantation evaluation [8]." ¹¹C-Acetate is useful in the validation of the metabolic reserve (1-7) and could be used to assess a broad range of myocardial oxygen consumption as demonstrated with pharmacological stimulating agents like metoprolol (1) and dobutamine (2-6).

References added:

1. Beanlands et al. The Effects of β_1 -Blockade on Oxidative Metabolism and the Metabolic Cost of Ventricular Work in Patients With Left Ventricular Dysfunction. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Positron-Emission Tomography Study. *Circulation*. 2000;102:2070-2075
2. Beanlands RS et al. Acute effects of dobutamine on myocardial oxygen consumption and cardiac efficiency measured using carbon-11 acetate kinetics in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22(5):1389-98.
3. Sundell et al. The Effects of Cardiac Resynchronization Therapy on Left Ventricular Function, Myocardial Energetics, and Metabolic Reserve in Patients With Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1027–33.
4. Yoshinaga et al. Reduced Oxidative Metabolic Response in Dysfunctional Myocardium with Preserved Glucose Metabolism but with Impaired Contractile Reserve *J Nucl Med* 2004; 45:1885–1891.
5. Hiesmayr et al. Effects of Dobutamine Versus Insulin on Cardiac Performance, Myocardial Oxygen Demand, and Total Body Metabolism After Coronary Artery Bypass Grafting. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1995; 9(6):653-658.
6. Van den Heuvel et al. Regional Myocardial Blood Flow Reserve Impairment and Metabolic Changes Suggesting Myocardial Ischemia in Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:19 –28.
7. Beanlands RS. Schwaiger M. Changes in myocardial oxygen consumption and efficiency with heart failure therapy measured by ^{11}C acetate PET. *Can J Cardiol*. 1995;11(4):293-300.

Chapitre 5. Autres travaux réalisés dans le cadre de cette thèse

Dans l'ensemble des travaux exécutés lors de mes études au doctorat, cette section comprend les travaux en cours ou en collaboration, pour lesquels mon implication a été importante et reliée avec les sujets traités dans ce document.

Afin d'être en mesure d'évaluer l'efficacité de nouvelles mesures cardioprotectrices lors de traitements associés au cancer du sein, plusieurs sous-projets de nature exploratoire ont été nécessaires. L'analyse cinétique en imagerie dynamique TEP nécessite une mesure adéquate de la fonction d'entrée, que ce soit en milieu clinique (Article 1) ou préclinique. À cette fin, nous avons participé à l'élaboration de deux approches originales de mesure de la fonction d'entrée pour les études précliniques.

Une première méthode qui donne accès au système sanguin pour l'évaluation de la fonction d'entrée chez le petit animal sans chirurgie invasive a été mise au point et fait l'objet de la section 5.1. Ces travaux ont été présentés lors d'une conférence internationale (abrégé joint à l'Annexe I).

Dans un deuxième temps, nous avons exploré la possibilité d'obtenir la fonction d'entrée d'une mesure totalement indépendante, obtenue par l'agent de contraste gadolinium-DTPA en IRM, et l'avons comparée avec celle du ^{18}F -FDG en TEP. Ces travaux, réalisés en étroite collaboration avec monsieur Éric Poulin de l'équipe du Dr Martin Lepage, sont résumés à la section 5.2. Ils ont conduit à une présentation lors d'une conférence internationale (abrégé joint à l'Annexe II) et à la rédaction d'un manuscrit en préparation pour le journal « Magnetic Resonance in Medicine ». Dans cette étude, la caractérisation de la fonction d'entrée artérielle des deux agents, Gd-DTPA utilisé en IRM et ^{18}F -FDG utilisé en TEP, a été analysée en modèle pharmacocinétique du taux métabolique de consommation du glucose par le myocarde. Dans les résultats préliminaires, l'utilisation de la fonction d'entrée du Gd-DTPA convertie en fonction d'entrée artérielle pour le ^{18}F -FDG est similaire aux résultats obtenus directement de la fonction

d'entrée dans l'analyse cinétique glycolytique du myocarde. Dans une optique de bimodalité, l'utilisation de la force de la résolution de l'IRM avec son agent de contraste Gd-DTPA, pour décrire la perfusion tumorale dans toute son hétérogénéité, pourrait avantageusement compléter l'information de l'activité glycolytique obtenue en TEP avec le ^{18}F -FDG.

Finalement, le modèle d'insuffisance cardiaque induite par la doxorubicine chez le rat nous a permis d'établir un protocole d'imagerie procurant de l'information sur la réserve de perfusion et de la consommation en oxygène (Article 3). Le passage à l'imagerie simultanée de la réponse au traitement du cancer du sein à la doxorubicine et de son impact cardiotoxique chez la souris représente une suite logique du projet. Les travaux initiés dans cette direction font l'objet de la dernière section de ce chapitre. Ces travaux ont aussi conduit à une présentation lors d'une conférence internationale, dont l'abrégé est joint à l'Annexe III.

Chapitre 5.1. Fonction d'entrée artérielle chez le rat sans chirurgie

Introduction

La modélisation cinétique des traceurs en TEP nécessite souvent l'utilisation de la fonction d'entrée artérielle (AIF). Chez le petit animal, les difficultés d'obtenir la fonction d'entrée sont dues à la grosseur des vaisseaux, la faible quantité totale de sang de l'animal ainsi que la difficulté d'effectuer les ponctions sanguines. Nous avons développé une méthode pour obtenir la fonction d'entrée chez le rat en utilisant un compteur microvolumétrique externe (MBC) connecté à l'artère caudale (artère de la queue) et une pompe péristaltique. Cette approche ne nécessite pas de chirurgie, ce qui n'oblige pas de sacrifier l'animal après la procédure, et est donc bien adaptée pour des études longitudinales.

L'utilisation d'une pompe péristaltique nous donne accès au sang tout au long de l'expérience et nous permet d'obtenir de l'information supplémentaire par le biais des analyses biochimiques, ce qui est souvent requis lors des analyses pharmacocinétiques. La quantité de sang chez le rat est généralement autour de 6,4 mL/100 g (Lee et Blaufox, 1985). Le volume de sang disponible est donc très limité, comparativement à la quantité disponible chez l'humain. Par contre, lors de la caractérisation d'un nouveau radiotracer, il peut s'avérer très utile d'avoir accès à des échantillons de sang pour en caractériser les métabolites sanguins. Un autre avantage serait dans l'analyse des marqueurs biologiques lors de l'évaluation d'une réponse favorable ou non à un traitement pharmacologique. Les prélèvements sanguins permettent entre autres d'obtenir les taux de glycémie utiles lors d'évaluation glycolytique avec le ^{18}F -FDG (Ménard et al., 2010) et même d'établir une fonction d'entrée des métabolites dans le sang, produite par un radiotracer (Buck et al., 1991). Les techniques d'analyses cinétiques en imagerie dynamique TEP utilisent généralement la fonction d'entrée du radiotracer pour modéliser le comportement de celui-ci dans la région ou l'organe étudié.

Encore aujourd'hui, les prélèvements artériels demeurent la référence dans la détermination de la fonction d'entrée, qu'ils soient effectués de façon manuelle ou avec un équipement automatisé. Chez le rongeur, cette procédure nécessite généralement une chirurgie et est

inappropriée dans les études longitudinales car l'acte représente un caractère invasif qui peut altérer la physiologie normale du sujet à l'étude.

Dans cette étude, l'utilisation d'un MBC, couplée à une pompe péristaltique, donne l'accès à l'analyse biochimique et à la fonction d'entrée artérielle du radiotracer ^{18}F -FDG.

Procédures expérimentales

Des rats mâles ($n = 18$) de type Fisher (280 ± 60 g) ont été anesthésiés sous isoflurane à 1,5% de concentration avec un débit d'oxygène d'un litre/minute pendant la durée du protocole d'imagerie. L'injection du radiotracer a été effectuée par la veine caudale de l'animal avec une aiguille de calibre 23G. Les prélèvements par l'artère caudale et l'artère fémorale utilisent une tubulure (PE50, Becton Dickinson). Pour l'artère caudale, la tubulure est accouplée à une aiguille de calibre 25G. Deux types de procédures ont été nécessaires pour permettre l'utilisation de la fonction d'entrée à partir de l'artère caudale avec le radiotracer ^{18}F -FDG et le MBC. La première procédure a permis de comparer la fonction d'entrée obtenue par l'artère caudale à celle de l'artère fémorale en effectuant des prélèvements simultanés des deux artères lors de l'injection du radiotracer. Chaque site de prélèvement a été utilisé de façon égale, que ce soit pour effectuer les prélèvements de façon manuelle ou lors de l'utilisation du MBC ($n = 6$). La deuxième procédure a validé l'utilisation du MBC dans la détermination de la fonction d'entrée pour l'analyse cinétique compartimentale. La procédure consiste à comparer l'analyse cinétique du taux de consommation myocardique du glucose avec le ^{18}F -FDG et les données des fonctions d'entrée obtenues par prélèvement artériel d'un seul site à la fois : l'artère caudale avec prélèvement manuel ($n = 5$), l'artère caudale avec l'utilisation du MBC ($n = 5$) et l'artère fémorale avec l'utilisation du MBC ($n = 3$). L'acquisition TEP a été effectuée sur un scanner LabPET8 (Gamma Medica/GE Healthcare) avec un champ de vue transaxial de 11 cm et axial de 7,5 cm. Des acquisitions dynamiques de 45 minutes débutant 30 secondes avant l'injection de 26 ± 12 MBq, dans un volume de 300 μL et avec un débit de 900 $\mu\text{L}/\text{minute}$ de ^{18}F -FDG ont été effectuées. Une séquence de reconstruction de: 1×30 s, 12×10 s, 6×30 s, 6×150 s, 2×5 min et 1×15 min avec une reconstruction itérative de type « MLEM », a été utilisée. Une matrice de $160 \times 160 \times 63$ avec une taille de voxel de $0,5 \times 0,5 \times 1,175$ mm³ ainsi que 10 itérations ont été choisies pour reconstruire les images utilisées pour l'analyse cinétique. Une région d'intérêt

manuelle a été tracée sur le myocarde sur l'image de la dernière séquence et transposée sur le reste de l'acquisition pour obtenir la courbe de radioactivité du myocarde dans le temps. Les fractions d'éjection ventriculaire gauche ont été extraites de la séquence de temps 30 à 45 minutes par analyse synchronisée au rythme cardiaque (logiciels cardiaques Corridor4DM, Segami Oasis, Columbia, MD, USA) pour évaluer l'impact du volume total prélevé lors des prélèvements simultanés par les deux artères, comparativement à l'utilisation d'un seul site de prélèvement. Les temps de prélèvements artériels manuels lors de l'acquisition sont de 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 90, 120, 180 sec et 5, 10, 20, 30 min pour un volume sanguin total prélevé de $823 \pm 90 \mu\text{L}$. De façon systématique, le MBC a été placé à 40 cm de l'artère et le réglage de la pompe péristaltique fixé à une vitesse de $30 \mu\text{L}/\text{min}$. Les analyses cinétiques myocardiques du taux de consommation du glucose (MMRG) ont été réalisées par analyse graphique Patlak et l'analyse cinétique classique à trois compartiments. L'analyse graphique Patlak avec l'utilisation de la fonction d'entrée du MBC demande seulement une correction pour le délai du temps lors de son utilisation; par contre, l'analyse cinétique à trois compartiments demande une correction supplémentaire qui est décrite dans la section suivante. Le délai du temps correspond au temps que prend le sang, une fois l'injection radioactive effectuée, pour parcourir la tubulure à un débit de $30 \mu\text{L}/\text{min}$ et être détecté par le MBC (Figure 5.1.1. A).

Explication de la méthode de correction pour la dispersion lors de l'utilisation du MBC

Lorsqu'un fluide comme le sang s'écoule dans une tubulure, plusieurs trajectoires d'écoulement, situées généralement à proximité de la trajectoire du sens de l'écoulement, sont répertoriées. La dispersion est caractérisée par cette diversité des directions d'écoulement. Selon les trajectoires, il est possible d'observer des particules ayant peu ou pas de contact avec la surface de la tubulure ayant ainsi une vitesse de parcours supérieure à l'ensemble moyen du système en mouvement. Il est également possible d'observer des particules ayant des trajectoires qui rencontrent plusieurs obstacles et qui seront reflétées par une vitesse réduite d'écoulement. L'augmentation des contacts avec les parois et des collisions avec les autres particules du fluide augmentent généralement la dispersion du sang observé dans la tubulure, ce qui correspond à un plus grand étalement des vitesses d'écoulement. Nous avons utilisé une méthode de correction en deux étapes afin de corriger adéquatement les données obtenues par le MBC. La première étape de correction s'applique sur la clairance, portion d'élimination de la radioactivité du sang à la

suite de l'injection du radiotraceur (Figure 5.1.1. B section B). La seconde étape de correction s'applique sur la portion lors de l'injection du radiotraceur dans le système sanguin (Figure 5.1.1B section A).

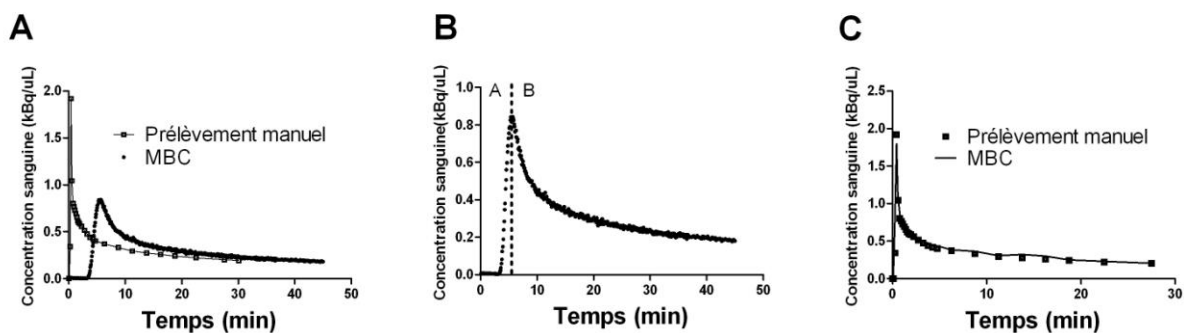


Figure 5.1.1. – Graphique de la fonction d'entrée artérielle (AIF) obtenue à partir d'un prélèvement manuel (carré) ou en utilisant le compteur microvolumétrique sanguin (MBC) (cercle) au ^{18}F -FDG chez le rat. (A) Données brutes. (B) La ligne pointillée représente la séparation pour l'application de la correction pendant la durée de l'injection et pendant l'élimination du radiotraceur afin d'obtenir la fonction d'entrée correspondant au prélèvement manuel. (C) L'AIF du MBC corrigée pour la dispersion observée dans la tubulure de prélèvement qui est corrélée à l'interpolation linéaire de l'AIF par les prélèvements manuels (carré).

Le pic de concentration sanguine maximale du MBC est d'abord ajusté pour déterminer le retard T (délai du temps) par rapport à l'injection, ce qui permet de réduire le nombre de paramètres de l'équation mathématique. Le pic de radioactivité correspond à la séparation de la courbe en deux parties. La portion d'élimination de la radioactivité du sang est corrigée en utilisant la méthode décrite par Munk et al (Munk et al., 2008). La dispersion observée dans notre expérience est trop importante pour corriger l'ensemble de la courbe par cette équation. Lorsque la dispersion est très importante, l'équation décrite par Munk et al. devient une correction quasi exclusivement exponentielle et même ce type de correction demeure insuffisante pour corriger adéquatement l'effet de dispersion observé par l'utilisation des données du MBC comparativement au prélèvement effectué manuellement.

Dans l'équation ci-dessus, $C_i(t)$ est la concentration sanguine corrigée, $C_0(t)$ représente les données brutes telles que mesurées par le MBC et α et k représentent les deux variables qui décrivent la relation entre le MBC et les prélèvements manuels. Ces corrections nous permettent d'obtenir la fonction d'entrée correspondant aux prélèvements manuels, validée à partir de l'expérimentation à double site de prélèvement ($n = 6$). Dans l'expérience, les valeurs de $0,53 \pm 0,12$ et $2,90 \pm 1,78 \text{ min}^{-1}$ ont été obtenues pour les constantes α et k . Cette correction sur la portion de la courbe qui correspond à l'élimination de la radioactivité du sang nous permet d'obtenir le pic maximal d'activité réelle lors de l'injection. La deuxième étape consiste à corriger la courbe de radioactivité obtenue pendant l'injection du radiotracer; cette deuxième équation utilise une fonction exponentielle modulée par une fonction sigmoïde, décrite par McGrath et al. (McGrath et al., 2009).

$$C_i(t) = \frac{e^{-at}}{(1 + e^{-s(t-\tau)})}$$

Dans l'équation ci-dessus, $C_i(t)$ est la concentration dans le sang, a est la constante de l'exponentielle, s et τ représentent respectivement la largeur et le centre de la sigmoïde. Dans cette expérience, nous avons corrélié les prélèvements manuels aux valeurs obtenues du MBC et par régression linéaire, nous avons établi les équations pour déterminer les variables a et s en fonction de la concentration sanguine maximale ($n = 6$). Afin de définir la portion de la courbe représentant la période d'injection du radiotracer dans le sang, nous utilisons donc la concentration sanguine maximale (kBq/ μ L) obtenue à partir de la première correction (décrite par Munk et al) et par les équations linéaires, nous déterminons (a), la constante exponentielle, et (s), la largeur de la sigmoïde (Figure 5.1.2). Nous avons utilisé une pompe automatique pour l'injection du radiotracer; il est donc plausible d'émettre l'hypothèse que nos injections sont reproductibles et similaires. De cette façon, nous pouvons fixer le temps milieu (τ) du paramètre de la sigmoïde. Ainsi, les paramètres a et s seront déterminés expérimentalement.

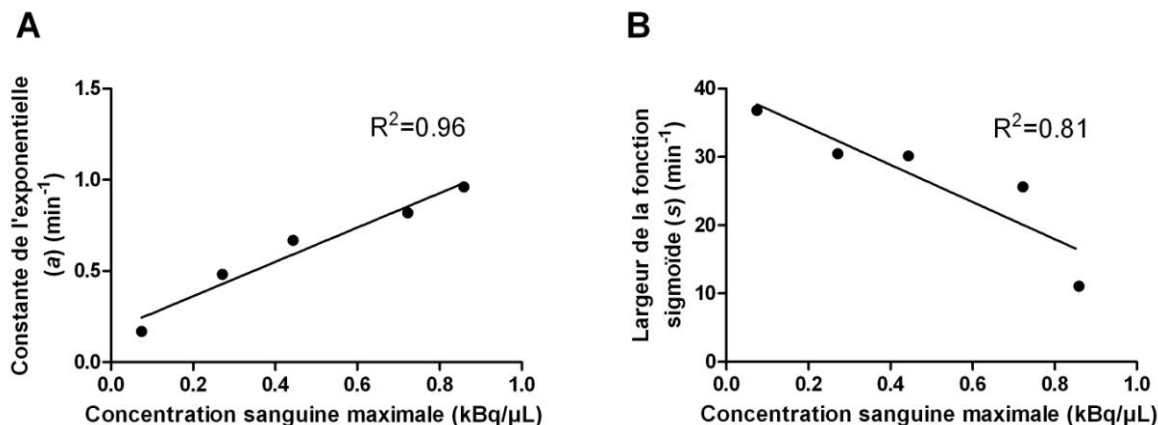


Figure 5.1.2. – Représentation graphique de a , la constante de l'exponentielle, (A) et de s , la largeur de la sigmoïde, (B) en fonction de la concentration sanguine maximale (kBq/μL).

Résultats

Statistiquement, la glycémie est comparable entre toutes les études de cette expérience (prélèvement simultané de l'artère caudale et de l'artère fémorale $11,5 \pm 2,4$ mmol/L, prélèvement d'un seul site de prélèvement à la fois $12,5 \pm 2,2$ mmol/L, test- t non-pairé, $p = 0.42$).

Dans la première expérience, les fonctions d'entrée obtenues par prélèvement manuel sont comparées aux fonctions d'entrée obtenues par le MBC corrigé pour la dispersion par la méthode décrite précédemment. Dans la moitié des expériences, le MBC utilisait l'artère fémorale et les prélèvements manuels étaient effectués sur l'artère caudale ($n = 3$), alors que dans l'autre moitié de l'expérience, les prélèvements manuels et le MBC ont été inversés, afin d'éviter un biais systématique.

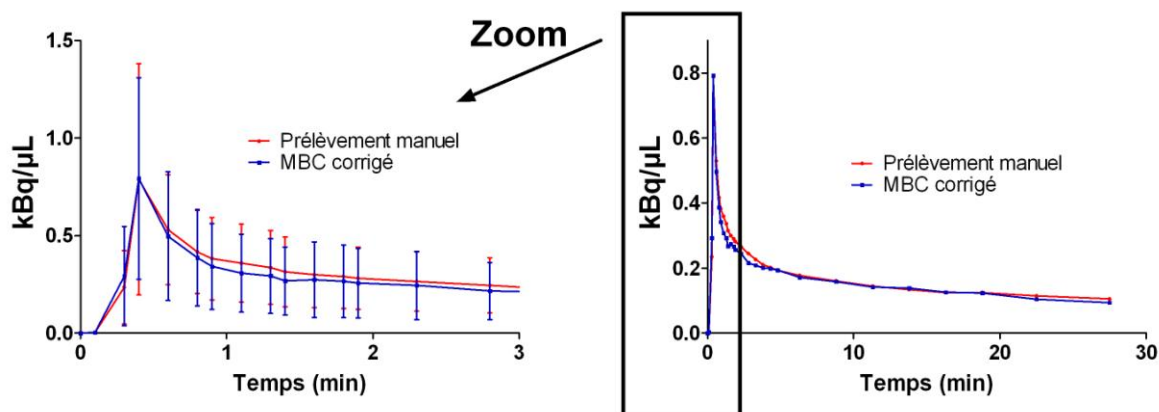


Figure 5.1.3. – Graphique de la fonction d'entrée artérielle (AIF). Le sang a été prélevé simultanément à partir de l'artère caudale et de l'artère fémorale, manuellement (rouge, $n = 6$) et avec le MBC corrigé pour la dispersion (bleu, $n = 6$).

Afin de comparer mathématiquement la précision des deux courbes de fonction d'entrée (figure 5.1.3.), l'aire sous la courbe a été comparée (test- t pairé, $p = 0,49$) et nous avons aussi modélisé la courbe et comparé les valeurs obtenues entre elles. La courbe a été décrite par une fonction rectangulaire qui représente l'injection du radiotracer convoluée à une fonction bi-exponentielle représentant le système biologique (explication plus exhaustive dans la section 5.2) (Pellerin et al., 2007). L'équation mathématique nous donne cinq paramètres qui sont comparés entre la fonction d'entrée manuelle et la fonction d'entrée du MBC corrigée (test- t pairé, $p > 0,05$). L'évaluation myocardique du taux métabolique du glucose (MMRG) par l'utilisation de ces deux fonctions d'entrée s'avère similaire, que ce soit avec l'analyse graphique Patlak ou l'analyse cinétique à trois compartiments (valeur p , test- t pairé) (figure 5.1.4.).

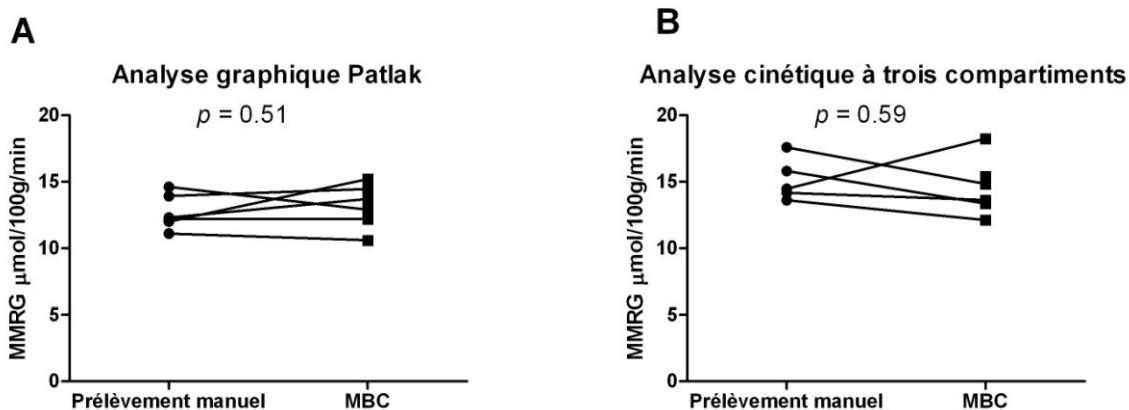


Figure 5.1.4. – Diagramme de dispersion du taux métabolique de consommation du glucose par le myocarde (MMRG) obtenu à partir de l'analyse graphique Patlak (A) et du modèle classique à trois compartiments (B). Le sang a été prélevé simultanément de l'artère caudale et de l'artère fémorale de façon manuelle et avec le MBC.

De plus, afin d'évaluer l'utilisation de la fonction d'entrée obtenue à partir des données du MBC corrigées pour la dispersion ou non, trois études séparées à un seul site de prélèvement artériel ont été effectuées. L'analyse statistique ne démontre aucune différence dans l'obtention du MMRG par site de prélèvement de l'artère avec l'utilisation du MBC non corrigé ou corrigé pour la dispersion (test d'analyse de variance à un seul facteur « one-way ANOVA ») (figure 5.1.5.).

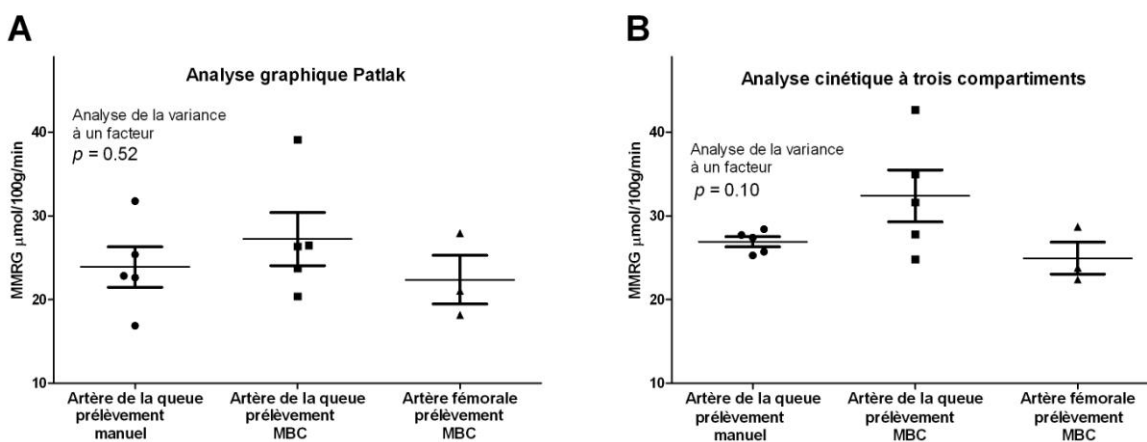
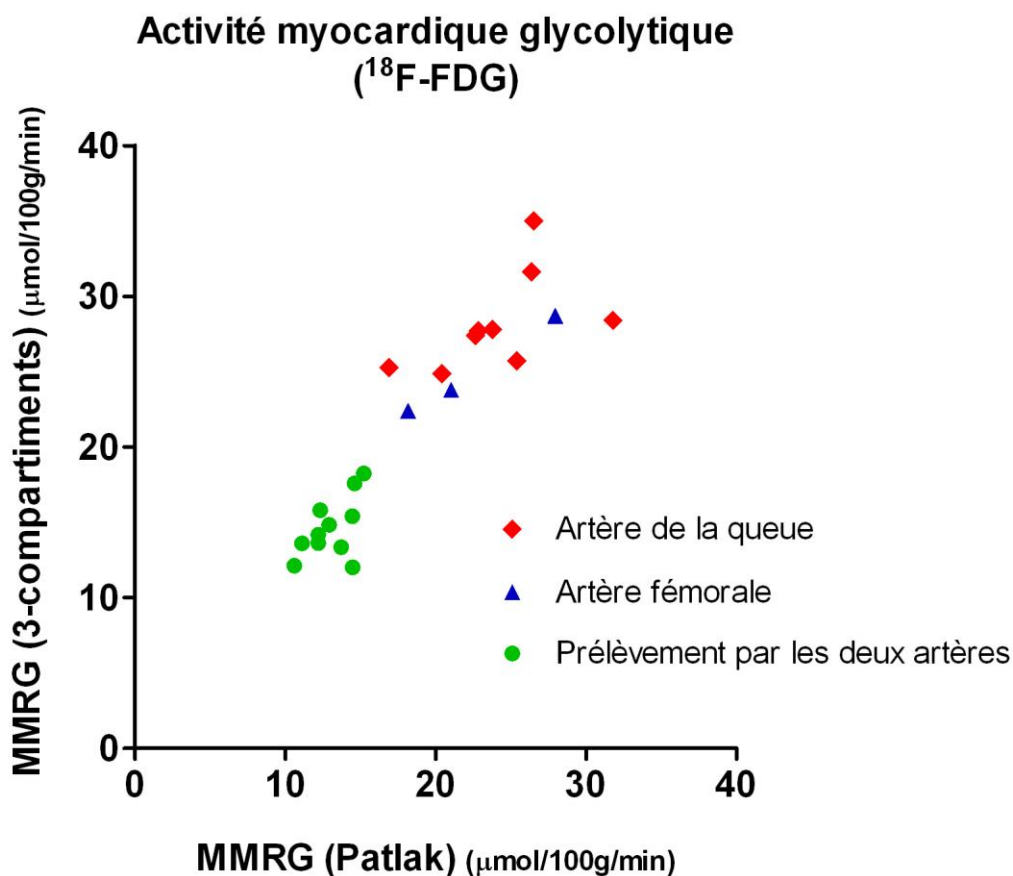


Figure 5.1.5. – Diagramme de dispersion du taux métabolique de consommation du glucose par le myocarde (MMRG) à un seul site de prélèvement. (A) Analyse graphique Patlak et (B) analyse cinétique classique à trois compartiments.

Les valeurs de MMRG en fonction du volume de prélèvement sanguin (double prélèvement vs un seul site de prélèvement) démontrent une diminution qui pourrait être en lien avec un volume de prélèvements excédentaire à 10% du volume total de l'animal (Figure 5.1.6.). Lors des prélèvements simultanés des deux artères, le volume de prélèvement correspond à $2,7 \pm 0,7$ mL comparativement au volume d'un seul site de prélèvement $1,0 \pm 0,3$ mL. Les valeurs de MMRG chutent à $12,9 \pm 1,4$ $\mu\text{mol}/100$ g/min lors d'un double prélèvement comparativement aux valeurs normales à un seul site de prélèvement $24,8 \pm 5,9$ $\mu\text{mol}/100$ g/min. Nous observons aussi une chute de la fraction d'éjection ventriculaire gauche lors du double prélèvement à $47,2 \pm 6,8\%$, comparativement à $59,7 \pm 4,4\%$ lors d'un seul site de prélèvement, ce qui est souvent relié à l'état de choc hémorragique (test-*t* pairé, $p = 0,0013$).



Graphique 5.1.6. – Corrélation des taux métaboliques de consommation du glucose par le myocarde (MMRG) obtenus par analyse graphique Patlak et le modèle à trois compartiments. Les résultats démontrent l'impact du sang retiré par deux accès simultanément, l'artère caudale

et l'artère fémorale (vert, n = 12), comparativement à un site unique de prélèvement, l'artère caudale (rouge, n = 10) ou l'artère fémorale (bleu, n = 3).

Discussion

Règle générale, lors d'analyses cinétiques TEP, nous avons besoin de deux courbes d'activité dans le temps, la courbe de radioactivité dans le sang et la courbe de l'organe étudié. En imagerie moléculaire, le cerveau, le cœur, le foie, les reins et les foyers néoplasiques sont les principaux tissus cibles. Dans notre étude, la fonction d'entrée a été obtenue par une procédure d'accès au système artériel via l'artère caudale sans la nécessité d'une chirurgie invasive. Nous avons établi une correction de la dispersion lors de l'utilisation de prélèvement continu à l'aide d'un compteur sanguin externe (MBC) et d'une pompe péristaltique. Cette approche a été validée par l'analyse de la fonction d'entrée obtenue simultanément via les artères caudale et fémorale, et deux types d'analyse cinétique myocardique de consommation du glucose qui utilisent cette fonction d'entrée.

À partir de l'expérience des prélèvements simultanés, nous pouvons conclure que des prélèvements manuels ou automatiques à l'aide du MBC, via l'artère caudale ou fémorale, permettent d'obtenir une fonction d'entrée et des MMRG similaires. L'expérience des prises de sang artérielle simultanée de l'artère caudale et de l'artère fémorale nous a permis de valider les données obtenues de l'artère caudale avec ou sans le MBC. Dans les expériences subséquentes, règle générale, le fait de prendre un volume sanguin supérieur à 10% du volume sanguin total de l'animal pourrait modifier l'état métabolique du sujet. Pour la corrélation des fonctions d'entrée, l'expérience qui excédait le volume sanguin généralement suggéré était nécessaire et a permis d'évaluer une corrélation des aires sous la courbe et de comparer les valeurs obtenues par les courbes décrites par la fonction rectangulaire convoluée à la fonction bi-exponentielle.

L'analyse graphique Patlak utilise la portion tardive de la fonction d'entrée et confirme la corrélation entre la fonction d'entrée tirée de l'artère caudale et celle obtenue par l'artère fémorale pour le calcul des MMRG sans correction de dispersion. L'utilisation entière de la fonction d'entrée nécessaire pour l'analyse cinétique à trois compartiments confirme que les corrections de dispersion et de délai appliquées lors de l'utilisation du MBC sont adéquates. L'expérience de prélèvement à un seul site démontre une variabilité plus importante des valeurs

de MMRG que celles obtenues lors des prélèvements doubles. L'analyse s'effectuant sur le même sujet élimine la variabilité possible dans les états de consommation glycolytique qui peuvent être plus fréquemment observés entre les individus.

En conclusion, lorsque la fonction d'entrée est requise pour la modélisation cinétique des radiotraceurs, la collecte de sang via l'artère caudale avec MBC est une alternative intéressante. Cette méthode pourrait s'avérer particulièrement utile pour les études de suivi chez le même animal, ainsi que lorsque des analyses biochimiques sont nécessaires.

Chapitre 5.2 Utilisation de la fonction d'entrée Gd-DTPA en IRM dans l'analyse pharmacocinétique en TEP ^{18}F -FDG

Introduction

Les études longitudinales en recherche préclinique exigent souvent de simplifier des procédures d'imagerie, d'effectuer des protocoles d'imagerie courts et d'éviter le caractère invasif des chirurgies. Dans ce contexte, une fonction d'entrée obtenue en IRM à l'aide de l'agent de contraste Gd-DTPA, qui serait directement corrélée à celle du ^{18}F -FDG en TEP, aurait l'avantage d'éliminer l'utilisation des prélèvements sanguins, qui est souvent caractérisée par la nécessité d'une chirurgie. Une caractérisation simultanée des deux fonctions d'entrée IRM et TEP pourrait démontrer qu'elles sont interchangeables dans l'analyse pharmacocinétique qui leur est propre. Le Gd-DTPA est un agent paramagnétique qui transite dans le sang, n'entre pas dans la cellule et est éliminé par voie urinaire. Le ^{18}F -FDG est une molécule de sucre qui, injectée dans le sang, est transportée dans la cellule et y demeure capturée une fois phosphorylée, bien qu'une fraction importante soit éliminée par les reins. Malgré leurs caractères distincts, ces deux agents démontrent une cinétique sanguine qui se ressemble. L'objectif de cette étude était donc de caractériser les fonctions d'entrée et d'établir par traitement mathématique une conversion qui permet le passage d'une fonction d'entrée à l'autre.

Matériels et méthodes

Sept rats Fisher (240 ± 30 g) ont été utilisés pour cette expérience. Les animaux étaient sous anesthésie lors de la procédure d'imagerie (isoflurane 1,5% à 1 litre d'oxygène par minute). Un cathéter veineux 23 G avec PE50 (Becton Dickinson) a été installé dans la veine caudale pour l'injection et, par chirurgie, une tubulure a été insérée dans l'artère fémorale pour effectuer des prélèvements artériels lors de la séance d'imagerie. Une solution mixte de 41 ± 8 MBq de ^{18}F -FDG et de 0,1 mmol/g de Gd-DTPA dans un volume de 400 μl a été injectée sur 1 minute à l'aide d'un injecteur automatique.

Une acquisition dynamique de 50 minutes de la région du cœur a été réalisée avec un scanner TEP de type LabPET4 (GE Healthcare), ayant une résolution du plan de coupe transaxial de 1,3 mm. Le rythme cardiaque, la respiration et la température ont été suivis durant toute l'expérience.

d'imagerie. Une série dynamique de 27 images a été reconstruite comme suit : 12×10 sec, 6×30 sec, 6×150 sec, 2×5 min et 1×20 min. La taille du voxel est de $0,5 \times 0,5 \times 1,175$ mm³. La courbe d'activité dans le temps du myocarde a été générée par l'application d'une région d'intérêt tracée manuellement sur la dernière image et transposée sur la séquence en entier.

Des échantillons de sang ont été prélevés à 0, 15, 30, 45, 60, 90, 150 sec et 4, 5, 10, 15, 20, 30 min. Les concentrations plasmatiques du ¹⁸F-FDG et Gd-DTPA ont respectivement été déterminées avec un compteur gamma et par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICPMS). Les courbes de concentration et de radioactivité dans le temps ont été définies par une équation mathématique qui est caractérisée par une fonction rectangle convoluée à une fonction bi-exponentielle (figure 5.2.1.) (Pellerin et al., 2007).

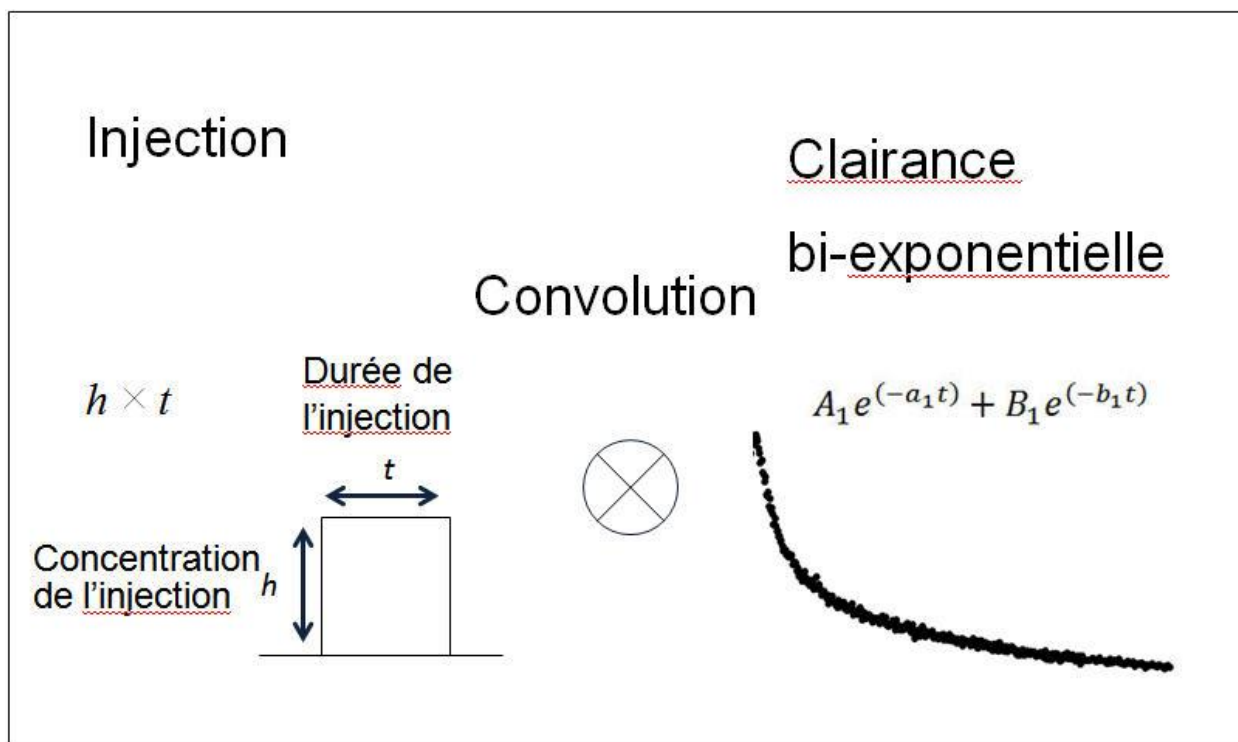


Figure 5.2.1 – Représentation mathématique générale d'une injection radioactive ou d'un agent de contraste en IRM dans un système sanguin. La fonction rectangle représente l'injection du mélange (¹⁸F-FDG et Gd-DTPA), alors que l'équation bi-exponentielle représente la clairance sanguine. *Figure traduite et extraite du manuscrit en préparation d'Eric Poulin, étudiant à la maîtrise de l'Université de Sherbrooke.*

Les résultats expérimentaux des deux fonctions d'entrée, ^{18}F -FDG et Gd-DTPA ($n = 7$), démontrent que la montée ainsi que la première partie de la descente sont similaires entre les deux agents, alors que lors du changement de pente de la descente nous visualisons une séparation. La modélisation mathématique a permis le passage d'une fonction d'entrée à l'autre par un simple changement de la portion tardive de la courbe. La fonction d'entrée artérielle du ^{18}F -FDG extraite manuellement et la fonction d'entrée artérielle convertie à partir du Gd-DTPA ne sont pas statistiquement différentes (test- t pairé, $p \gg 0,05$).

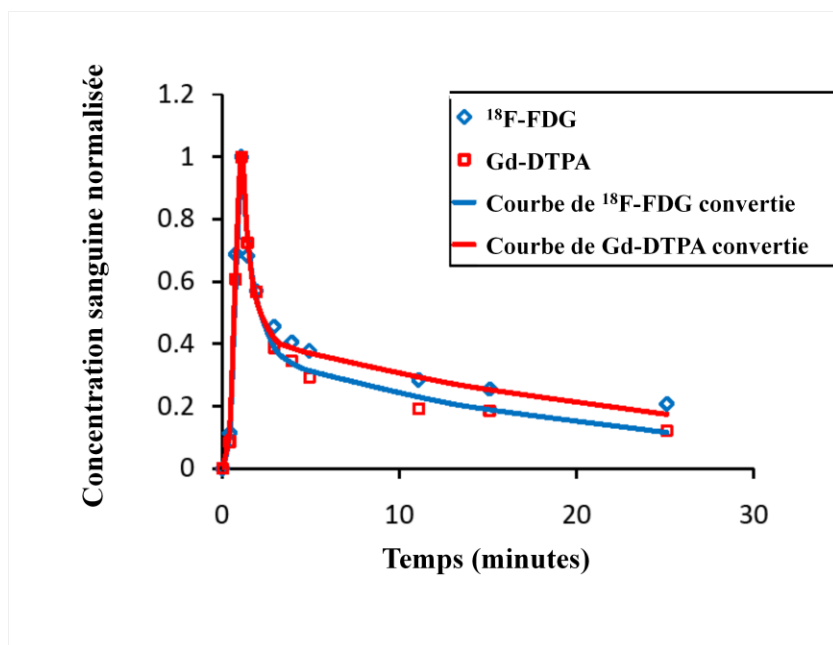


Figure 5.2.2 – Représentation graphique des prélèvements plasmatiques du mélange injecté et normalisé au maximum d'intensité (^{18}F -FDG et Gd-DTPA) (représenté par des points) et représentation de la conversion du passage d'une fonction d'entrée à l'autre (représentée par des lignes). *Figure traduite et extraite du manuscrit en préparation d'Eric Poulin, étudiant à la maîtrise de l'Université de Sherbrooke.*

Par la suite, la validation de l'utilisation de la fonction d'entrée obtenue par l'agent de contraste a été corrélée par l'analyse du taux métabolique de consommation du glucose par le myocarde (MMRG).

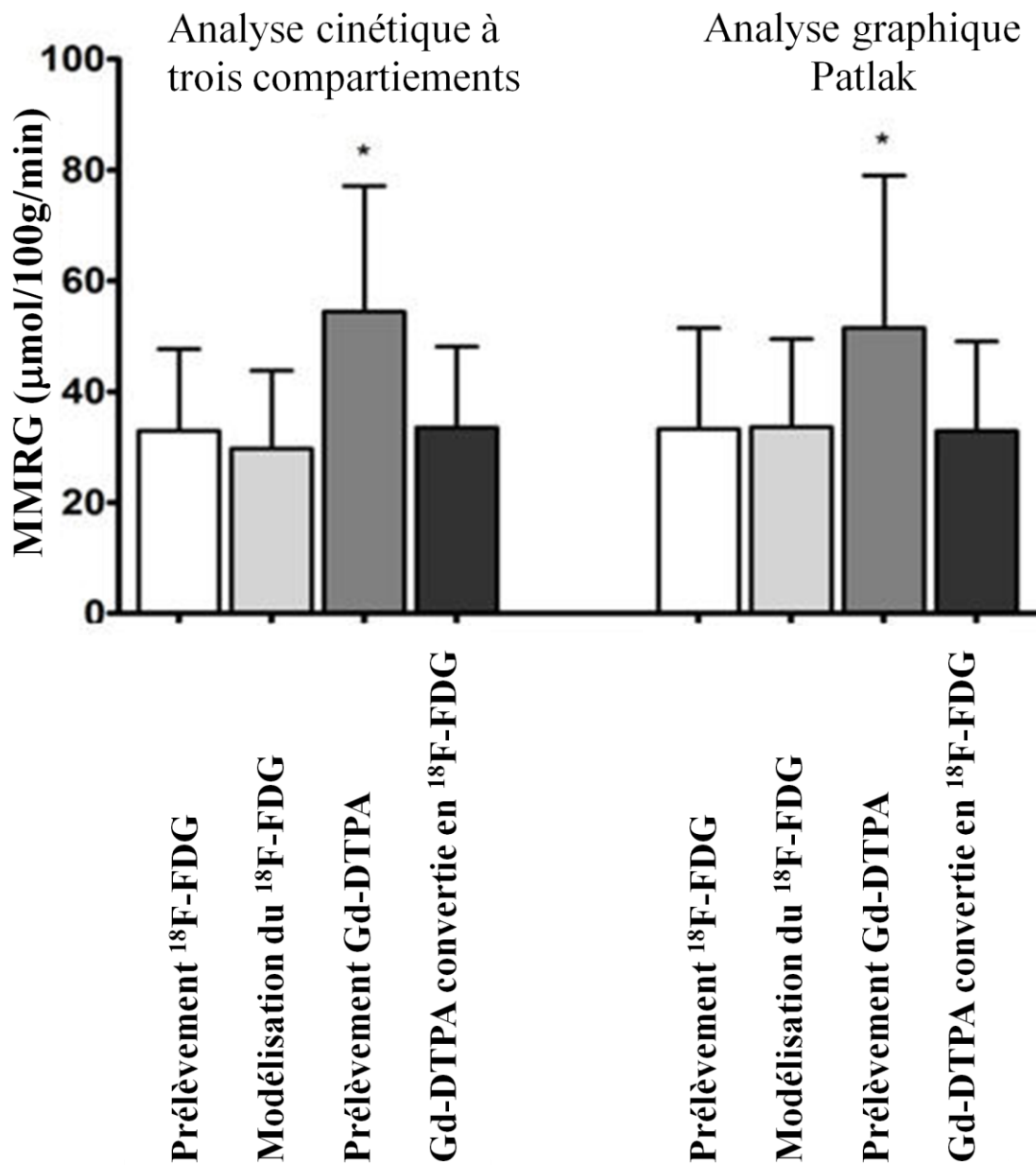


Figure 5.2.3 – Graphique des résultats de l'utilisation des différentes fonctions d'entrée dans la détermination du taux métabolique de consommation du glucose par le myocarde. *Figure traduite et extraite du manuscrit en préparation d'Eric Poulin, étudiant à la maîtrise de l'Université de Sherbrooke.*

Les résultats de MMRG démontrent la possibilité d'utilisation de la fonction d'entrée obtenue à partir de l'agent de contraste Gd-DTPA. La caractérisation et l'identification des facteurs pour effectuer le passage d'une fonction d'entrée à l'autre donnent la possibilité d'exploiter l'imagerie bimodale pour l'analyse cinétique, et non seulement pour les détails de l'image anatomique.

Conclusion : Il est possible de convertir la fonction d'entrée artérielle, obtenue en prélèvement manuel du Gd-DTPA en fonction d'entrée artérielle de ^{18}F -FDG et vice versa chez le rat. La fonction d'entrée du ^{18}F -FDG, dérivée de la fonction d'entrée artérielle du Gd-DTPA, peut être utilisée pour la modélisation pharmacocinétique TEP du MMRG.

Chapitre 5.3 Évaluation simultanée de la réponse tumorale aux traitements à la doxorubicine et de son impact cardiotoxique chez la souris

Un protocole d'imagerie TEP a été conçu pour suivre simultanément la cardiotoxicité et la réponse tumorale à la chimiothérapie dans un modèle de souris préalablement inoculées de deux foyers de cellules de cancer du sein. Le ^{18}F -FDG permet de mesurer l'activité glycolytique tumorale et myocardique ainsi que la fonction cardiaque. Le ^{11}C -acétoacétate (AcAc) est utilisé pour évaluer la perfusion myocardique et la consommation d'oxygène.

Le protocole expérimental a été élaboré comme suit. Des souris Balb/c sont inoculées sur le dos avec des adénocarcinomes de cancer du sein (MC7-L1 et MC4-L2). Le traitement hebdomadaire à la doxorubicine (7,5 mg / kg) est amorcé quatre semaines après inoculation et poursuivi durant 8 semaines consécutives. La séance d'imagerie dynamique comporte deux acquisitions synchronisées sur le cycle cardiaque, la première de 20 min à l'AcAc (50 MBq) et une seconde de 45 min au ^{18}F -FDG (20 MBq). La séquence d'imagerie est initiée avant le début des traitements, puis à un mois et deux mois après le début des traitements. En quatre jours, avec 48 heures d'intervalle entre les séances d'imagerie pour une souris, deux séances d'imagerie d'AcAc combinées à l'imagerie aux ^{18}F -FDG permettent l'acquisition TEP de quatre souris (deux souris saines et deux souris traitées). Les résultats rapportés ici sont préliminaires avec des groupes incomplets, donc insuffisants pour établir des statistiques (travaux en cours).

L'analyse graphique Patlak du taux métabolique de consommation du glucose tumoral indique une légère tendance à la baisse de l'activité glycolytique à la chimiothérapie durant le traitement (Figure 5.3.1).

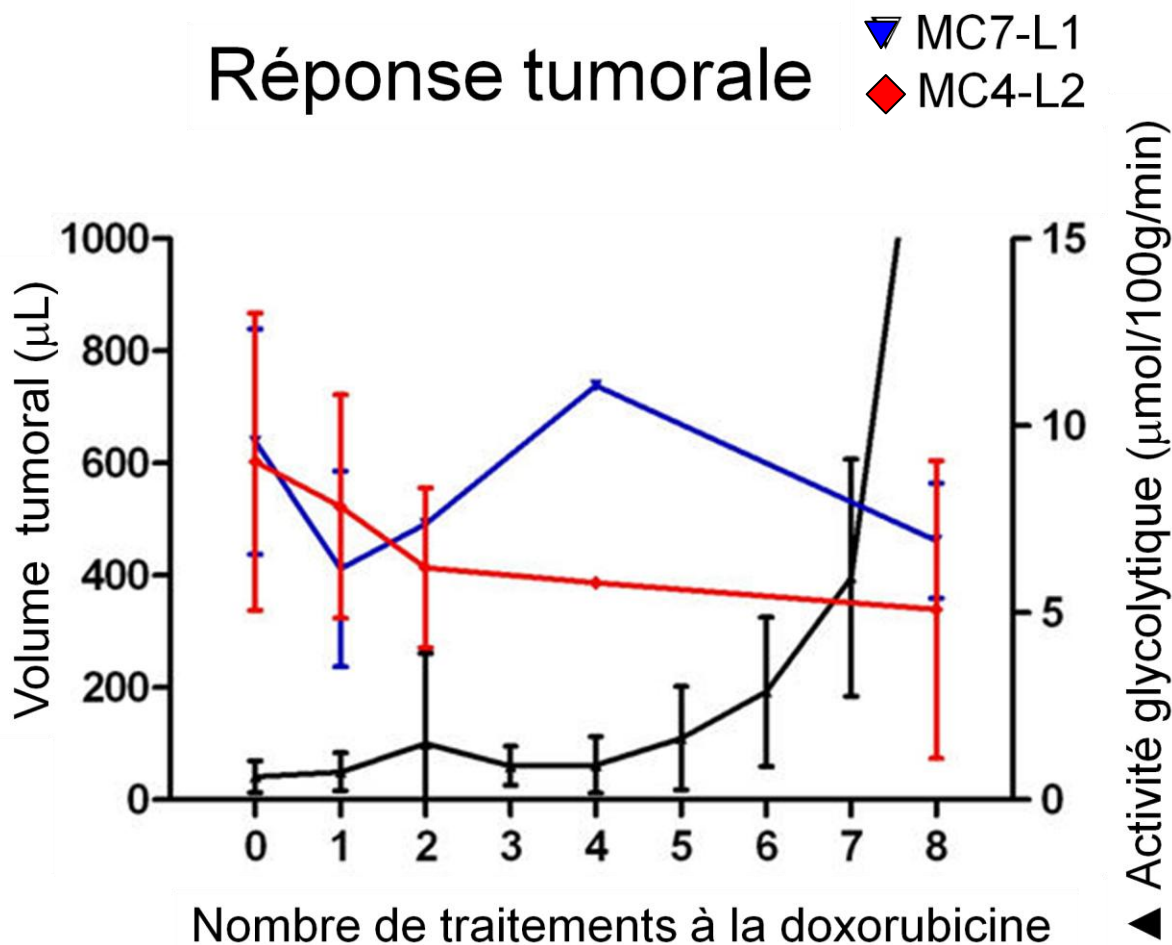


Figure 5.3.1 – Graphique des volumes tumoraux et de l’activité glycolytique tumorale en fonction du temps chez le groupe de souris traitées à la doxorubicine. *Figure extraite de la présentation par Suzanne Gascon au Congrès international annuel de la Society of Nuclear Medicine (SNM), tenu à San Antonio, États-Unis, du 4 au 8 juin 2011.*

L’étude cardiaque fait appel à l’analyse graphique Patlak pour l’évaluation du taux métabolique de consommation du glucose (MMRG) et à un modèle compartimental à trois compartiments pour évaluer la perfusion myocardique et la consommation en oxygène. Les valeurs initiales du MMRG au début du traitement sont de $78,2 \pm 1,9 \mu\text{mol} / 100 \text{ g} / \text{min}$ ($n = 9$). Les valeurs de base de perfusion et de consommation d’oxygène myocardique mesurées par AcAc étaient de $3,0 \pm 0,5 \text{ min}^{-1}$ et $1,3 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$, respectivement ($n = 4$). Nous observons déjà, avec les quelques résultats préliminaires, une tendance à la diminution de ces paramètres durant la période de suivi sous traitement (Figure 5.3.2).

Réponse myocardique

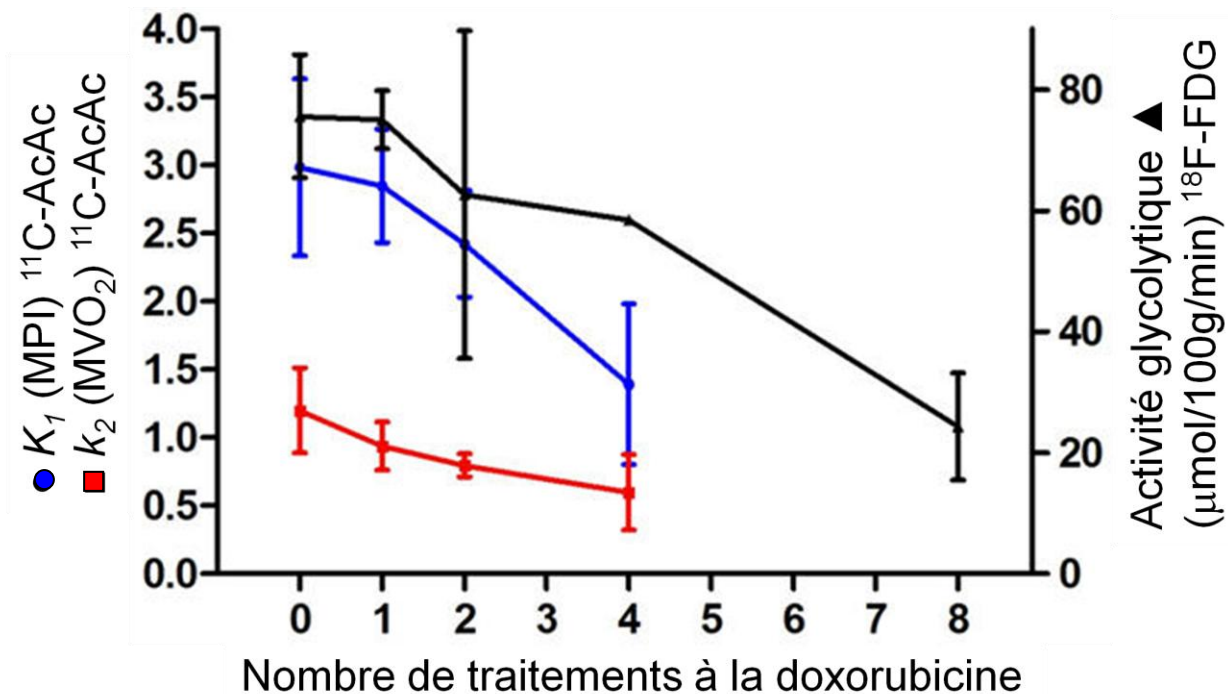


Figure 5.3.2 – Graphique des indices de perfusion (K_1), de consommation en oxygène (k_2) et de l'activité glycolytique myocardique (MMRG) en fonction du temps pour le groupe de souris traitées. Figure extraite de la présentation par Suzanne Gascon au Congrès international annuel de la Society of Nuclear Medicine (SNM), tenu à San Antonio, États-Unis, du 4 au 8 juin 2011.

Au niveau de la fonction cardiaque, nous observons (Figure 5.3.3) que la fraction d'éjection ventriculaire gauche a légèrement diminué durant cette période, soit d'environ 9% en 8 semaines selon les valeurs observées avec le radiotracer ^{18}F -FDG.

Fonction Cardiaque

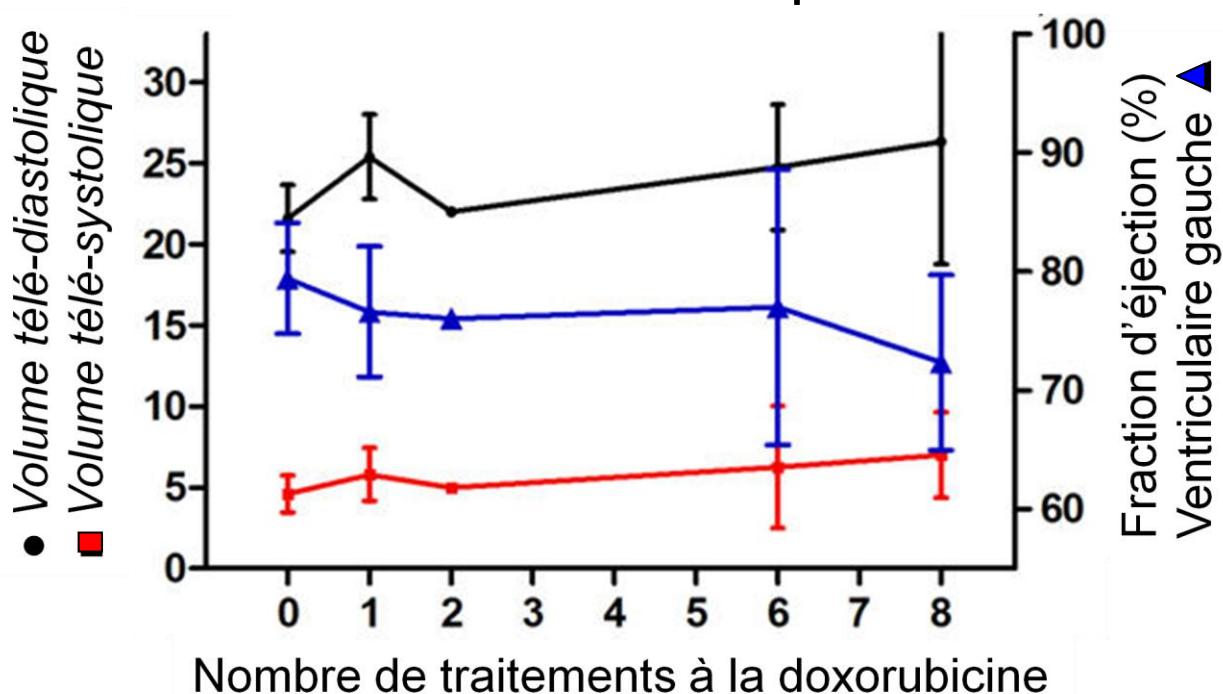


Figure 5.3.3 – Graphique de la fonction cardiaque chez la souris traitée. *Figure extraite de la présentation par Suzanne Gascon au Congrès international annuel de la Society of Nuclear Medicine (SNM), tenu à San Antonio, États-Unis, du 4 au 8 juin 2011.*

Ces études préliminaires tendent à démontrer que nous sommes en mesure d'effectuer un suivi simultané de la réponse tumorale aux traitements de doxorubicine et de son impact sur la fonction cardiaque. Les défis de la reproductibilité de telles mesures dans les études longitudinales sont toutefois de taille. L'accès au système sanguin chez la souris demeure une importante difficulté. La dimension du cœur est très près des limites de la résolution spatiale de l'appareil TEP. Les résultats préliminaires sont prometteurs pour l'obtention d'un protocole de suivi simultané. La corrélation des résultats avec des mesures en pathologie et des analyses biochimiques de marqueur de cardiotoxicité et d'apoptose seront nécessaires pour confirmer la validité de ces résultats.

Conclusion : L'imagerie TEP dynamique simultanée avec l'AcAc et le ^{18}F -FDG peut vraisemblablement être utilisée pour évaluer la perfusion et la consommation d'oxygène

myocardique, ainsi que l'activité glycolytique des tumeurs et du cœur dans un modèle de souris. Cette approche serait bien adaptée pour l'évaluation de nouvelles stratégies de chimiothérapie et de cardioprotection.

Chapitre 6. Discussion

L'imagerie moléculaire est devenue une discipline importante pour la compréhension des mécanismes et des voies biologiques. L'utilisation d'un radiotracer permet de suivre, *in vivo*, l'entrée dans un organe cible, sa métabolisation par des processus enzymatiques ou sa liaison à des récepteurs et de cette façon, l'imagerie moléculaire met en évidence des concepts observés *ex vivo*.

Lors d'un cancer du sein, les traitements de chimiothérapie à la doxorubicine ont comme effet secondaire principal une toxicité cardiaque. L'action de la doxorubicine agit différemment sur les cellules de division rapide, les foyers tumoraux comparativement aux cellules cardiaques. Cette toxicité cardiaque est principalement suivie par une évaluation fonctionnelle du cœur, la détermination de la fraction d'éjection ventriculaire gauche. L'objectif de cette thèse de doctorat a été de répondre à cette évaluation fonctionnelle du cœur par l'ajout significatif d'outils en imagerie moléculaire pour évaluer la relation entre la doxorubicine et la diminution de la fraction d'éjection cardiaque.

En clinique, l'imagerie moléculaire dynamique TEP et l'analyse cinétique augmentent l'information diagnostique par l'ajout d'index de perfusion ou d'activités métaboliques. L'utilisation de la fonction d'entrée dérivée de l'image permet de réduire l'exposition aux radiations du personnel et la complexité technique lors des prélèvements sanguins manuels. En préclinique, lors de l'utilisation du ^{18}F -FDG, cette réduction à l'exposition aux radiations est suggérée par l'utilisation d'un compteur microvolumétrique externe ainsi que par l'utilisation de l'agent de contraste Gd-DTPA utilisé en IRM. Toujours en préclinique, l'ajout d'un radiotracer myocardique qui caractérise la perfusion myocardique et la consommation en oxygène additionné à l'analyse de la fraction d'éjection pourrait contribuer à l'élaboration des voies d'actions qui protégeraient le cœur des agents toxiques utilisés dans les traitements oncologiques. Finalement, le modèle d'insuffisance cardiaque et d'évaluation de la réserve cardiaque met en évidence des mécanismes de perfusion et de consommation en oxygène diminué qui sont corrélés avec la fraction d'éjection et apporte des outils supplémentaires dans les approches à prendre afin de protéger le cœur de la cardiotoxicité. Les outils d'analyses cinétiques TEP, que ce soit pour l'oncologie ou la cardiologie, permettent d'évaluer plus

directement *in vivo* les relations d'insuffisance cardiaque à la toxicité de la doxorubicine (Aide et al., 2010).

Dans cette thèse, nous avons d'abord caractérisé l'utilisation clinique de la fonction d'entrée au niveau de l'artère fémorale et carotidienne, lors d'analyses cinétiques avec l'utilisation du ^{11}C -acétate, du ^{18}F -FTHA et du ^{18}F -FDG. L'utilisation de mires a permis de corrélérer l'analyse cinétique entre la fonction d'entrée dérivée de l'image et celle obtenue par prélèvements sanguins. Dans les études précliniques, l'analyse cinétique quantitative est aussi très importante lors de l'évaluation d'une réponse à un traitement de chimiothérapie, de radiothérapie ou dans l'analyse d'une voie biologique (Freedman et al., 2003). L'utilisation du compteur microvolumétrique sanguin couplé à une pompe péristaltique est un outil de validation de l'exactitude des données analysées. L'utilisation de cette méthode chez le petit animal a le potentiel de devenir un nouvel outil de validation dans la caractérisation de nouveaux radiotraceurs.

Par la suite, nous avons également introduit un nouveau radiotraceur cardiaque au niveau préclinique, le ^{11}C -acétoacétate, un corps cétonique. Ce nouveau radiotraceur tire son intérêt de son potentiel pour les études fondamentales du métabolisme cardiaque, et de son utilisation possible comme outil d'imagerie TEP dans l'évaluation future des agents cardioprotecteurs. Jusqu'à présent, l'implication des corps cétoniques dans le métabolisme myocardique a été relativement peu étudiée, et les mécanismes biochimiques responsables de l'inhibition de la bêta-oxydation ne sont pas encore très bien compris (Lopaschuk et al., 2010). Un radiotraceur comme le ^{11}C -acétoacétate a le potentiel d'intervenir dans le métabolisme mitochondrial (Squires et al., 2003; Veech et al., 2004), les mécanismes de réparation mitochondriale membranaire et la protection au stress oxydatif. Le ^{11}C -acétoacétate offre ainsi la possibilité d'investiguer plus à fond ces processus biologiques.

Finalement, nous avons mis au point chez le rat un modèle d'insuffisance cardiaque induit par la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique. Nous avons démontré une diminution des réserves de perfusion myocardique et de consommation en oxygène avec l'utilisation du ^{11}C -acétate, qui est corrélée avec la diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche. La création de ce modèle d'étude provient d'une observation clinique (Perez et al., 2004). La

cardiotoxicité associée à la doxorubicine pour des traitements de chimiothérapie est un effet indésirable qui limite la dose cumulée administrée. La création d'un modèle d'insuffisance cardiaque induit par la doxorubicine met à notre disposition un outillage supplémentaire pour l'étude d'agents de cardioprotection. Il est maintenant possible, avec l'imagerie moléculaire, d'étudier les voies métaboliques et de mettre en évidence des mécanismes propres de l'atteinte myocardique en utilisant des substrats énergétiques ciblés ou des inhibiteurs de voies métaboliques comme le fluoroacétate. L'acquisition d'information supplémentaire grâce à ce modèle animal pourrait être utile pour améliorer la compréhension de la relation entre la baisse de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et l'activité mitochondriale à produire de l'ATP par la phosphorylation oxydative.

Chapitre 6.1 Les objectifs précliniques

Une des améliorations sur les outils précliniques en imagerie moléculaire passe par la création d'examen facilement transposables en clinique qui l'utilisent des agents pharmacologiques et des procédures cliniquement acceptées. Les principaux obstacles dans les modèles précliniques sont les caractéristiques génétiques très homogènes des sujets étudiés, les diètes et leurs modes de vie peu variés, ainsi que l'accès et les volumes de prélèvements sanguins restreints chez les rongeurs. De plus, une séance d'imagerie nécessite généralement l'utilisation d'un agent anesthésiant, ce qui est très rarement utilisé en imagerie clinique. Lors de l'utilisation d'un radiotracer à court transit myocardique comme le $^{15}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ ou le $^{11}\text{C}\text{-acétate}$, les corrections quantitatives ont moins d'impact sur les index pharmacocinétiques étudiés. La contamination de la paroi myocardique à l'intérieur de la lumière du ventricule gauche (l'effet d'épanchement), lors de la détermination de la fonction d'entrée dérivée de l'image, est quasi inexistante et interfère peu dans la courbe de radioactivité sanguine en fonction du temps qui est utilisée pour l'analyse cinétique. Par contre, lors de l'utilisation de traceurs comme le $^{18}\text{F}\text{-FDG}$ ou le $^{18}\text{F}\text{-FTHA}$ qui s'accumulent dans le tissu myocardique, l'effet d'épanchement devient prépondérant et il est important de le corriger adéquatement afin d'obtenir une bonne quantification cinétique des données TEP. Que ce soit chez le modèle animal de rat ou de souris, les corrections d'effet de volume partiel et de contamination externe deviennent d'autant plus importantes, compte tenu de la petite taille de l'animal, de son rythme cardiaque plus élevé et de

son métabolisme basal plus rapide (Fang et Muzic, 2008; Maroy et al., 2010; Tantawy et Peterson, 2010).

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont permis d'initier trois projets qui s'inscrivent dans la continuité des objectifs poursuivis pour rendre l'imagerie TEP préclinique plus quantitative.

1) La fonction d'entrée dérivée de l'image chez le rongeur est de plus en plus utilisée. L'analyse de la concentration de substrats et des métabolites nous a conduit à l'élaboration d'une méthode de prélèvements sanguins via l'artère caudale du rat qui ne nécessite pas de chirurgie invasive ni le sacrifice de l'animal à la fin de la séance. Nous avons établi une méthode qui utilise un compteur radioactif externe pour extraire la courbe de la fonction d'entrée du radiotraceur, ainsi que le prélèvement d'échantillons sanguins avec l'utilisation d'une pompe péristaltique.

2) Compte tenu de l'émergence de l'imagerie multimodale TEP/IRM, aussi bien en milieu clinique que préclinique pour l'analyse des foyers tumoraux, nous avons orienté nos recherches vers une méthode d'extraction unique de la fonction d'entrée, qu'elle provienne d'un agent de contraste Gd-DTPA en IRM ou du ^{18}F -FDG en TEP pour l'analyse cinétique de la consommation de glucose. De cette façon, les analyses cinétiques combinées ont le potentiel de devenir synergiques dans l'analyse des foyers tumoraux et dans l'évaluation de leurs réponses face aux traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie.

3) Une imagerie qui permet d'observer simultanément la réponse au traitement oncologique et l'effet indésirable de la toxicité cardiaque dans un modèle d'insuffisance cardiaque et de cancer chez la souris.

En recherche préclinique, l'émergence de l'utilisation de l'imagerie multimodale (TEP, IRM et optique) permet d'entrevoir une caractérisation beaucoup plus précise des foyers tumoraux, d'explorer des voies de protection pour les cellules saines et de faire le suivi du traitement de la maladie. L'application préclinique de l'imagerie moléculaire permet souvent un passage plus rapide en étude clinique, de façon à tester des traitements utilisés de façon synergique, séquentielle ou modulée de chimiothérapie, de radiothérapie, d'hormonothérapie, de traitements

ciblés sur des récepteurs ou sur des mécanismes de réparation. Nous pouvons donc penser que l'imagerie moléculaire peut contribuer de façon significative à augmenter la survie médiane et la qualité de vie des patients atteints de cancer.

Chapitre 6.1.1. Les modèles animaux pour la recherche en TEP

L'analyse pharmacocinétique quantitative en modèle animal ouvre les portes à l'étude contrôlée des voies biochimiques *in vivo*. Les modifications génétiques de voies métaboliques chez les rongeurs ont conduit à des modèles pathologiques mieux définis pour lesquels nous pouvons, par des diètes précises, générer des modèles qui reflètent adéquatement la maladie humaine. L'éventail de modèles d'étude pour l'imagerie moléculaire cardiaque est impressionnant. Il est donc possible d'utiliser des rats hypertendus, diabétiques ou résistants à l'insuline, ou bien des souris ApoE -/- qui développent spontanément des cardiomyopathies, ou des souris avec des niveaux de cholestérol élevés, pour ne nommer que ceux-ci.

L'implantation chez la souris d'un modèle d'évaluation simultanée de la réponse tumorale au traitement de chimiothérapie et de l'impact de la toxicité sur le myocarde permet le développement et l'évaluation de nouvelles stratégies pour contrer la cardiotoxicité. En séance d'imagerie dynamique synchronisée TEP au ^{18}F -FDG, nous pouvons faire le suivi du traitement de chimiothérapie, de la fonction cardiaque et du métabolisme du glucose myocardique. L'utilisation de radiotraceurs comme ^{11}C -acétate ou ^{11}C -acétoacétate nous permet de déterminer la fonction cardiaque, la perfusion et la consommation en oxygène du myocarde en fonction de la réponse au traitement de chimiothérapie.

En recherche préclinique, l'utilisation de l'artère caudale pour obtenir la fonction d'entrée artérielle est peu invasive; de plus, avec le compteur de radioactivité externe (MBC) et l'utilisation d'une pompe péristaltique, il est possible d'obtenir des échantillons pour les analyses biochimiques et de simplifier la procédure, ce qui peut aider grandement dans les études longitudinales. Pour exploiter le pouvoir translationnel de l'imagerie, il est essentiel de réduire au minimum les variables différentes entre les études humaines et celles qui sont reproduites chez les animaux. L'élimination de la chirurgie de l'artère fémorale ou carotidienne,

généralement utilisée pour obtenir la fonction d'entrée, diminue le temps d'anesthésie ainsi que le caractère invasif de la procédure.

Toujours dans les modèles chez les petits animaux, l'utilisation de l'imagerie bimodale TEP/IRM permettrait d'obtenir une fonction d'entrée adéquate avec l'une ou l'autre des deux modalités pour l'analyse cinétique. En clinique, la bi-modalité est utilisée couramment, mais la TEP/TDM, la TEM/TDM et même le TEP/IRM sont généralement utilisées pour fournir des informations morphologiques qui appuient l'interprétation d'analyses physiologiques. L'injection des deux produits, ^{18}F -FDG (TEP) et Gd-DTPA (IRM), lors d'études dynamiques TEP concomitantes avec les prélèvements artériels dans le temps, a permis de caractériser les deux fonctions d'entrée. La détermination du taux métabolique du glucose cardiaque en TEP est statistiquement inchangée lors de l'utilisation de la fonction d'entrée du ^{18}F -FDG, ou la fonction d'entrée du ^{18}F -FDG convertie à partir de la fonction d'entrée de l'agent de contraste. Une perspective intéressante de l'utilisation des modalités TEP et IRM serait l'utilisation clinique bimodale en imagerie dynamique. La possibilité d'augmenter l'information du ^{18}F -FDG en imagerie dynamique pourrait devenir une procédure de routine lors d'imagerie de certains types de foyers tumoraux.

Chapitre 6.1.2. Les agents cardioprotecteurs

Une fois les travaux en cours terminés, les modèles de traitements oncologiques et cardiotoxiques bien établis chez la souris et la validation du ^{11}C -acétoacétate impliqué dans la réparation mitochondriale du myocarde prouvée, les perspectives à long terme que l'on peut entrevoir seraient l'évaluation de différents cardioprotecteurs. L'utilisation de nutraceutiques, l'utilisation de modèles génétiquement modifiés ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs tels le fluoroacétate pourraient permettre de protéger le cœur et caractériser davantage les phénomènes associés à la cardioprotection (Subramanian et al., 2010). Il a été démontré dans un article de revue (Minotti et al., 2004) que l'interprétation des résultats cliniques et précliniques diffère lorsque les doses d'utilisation ne sont pas les mêmes, et lorsque la concentration du produit dans le sang n'est pas la même. Dans cet article, il est mentionné qu'une concentration sanguine trop élevée d'agent chimiothérapeutique peut induire des phénomènes que nous n'observons pas *in vivo* lors de traitements cliniques. Il est important de toujours garder en tête que nous voulons

nous rapprocher le plus possible des situations cliniques : un modèle de souris traitée dans le temps reflète cette situation. L'imagerie TEP est l'outil translationnel de choix lorsque les protocoles *in vivo* sont bien utilisés et reflètent les doses et les traitements de chimiothérapie en clinique.

Chapitre 6.2. Les objectifs cliniques

Les perspectives en recherche clinique visent surtout la collaboration entre les chercheurs en imagerie moléculaire, les oncologues, les radio-oncologues, les cardiologues, les neurologues, les endocrinologues et les nucléistes, pour ne nommer que ceux-ci. L'implantation de nouvelles stratégies de thérapie et d'exams d'évaluation dans les bilans d'investigation de base ou de réponse tumorale face aux traitements devrait toujours se faire en concertation. Lorsque nous utilisons de nouveaux radiotraceurs, une modélisation cinétique quantitative adéquate avec l'utilisation de la fonction d'entrée permet d'augmenter l'information en obtenant de l'information en analyse cinétique.

L'examen de repos/effort au ^{11}C -acétate pourrait trouver une niche d'exploration fonctionnelle en clinique. Par exemple, il pourrait être avantageux d'évaluer la réserve myocardique chez une patiente qui doit recevoir des traitements à la doxorubicine. Dans ce cas précis, l'évaluation de la réserve de perfusion et de consommation en oxygène pourrait fournir un indice plus précoce que la fraction d'éjection ventriculaire gauche pour prédire si les effets secondaires néfastes outrepassent les bénéfices du traitement. L'application de ce type d'examen repos/effort au ^{11}C -acétate en clinique pourrait définir de nouvelles normes pour la dose limite cumulée dans certains types de traitements de chimiothérapie, en fonction des résultats de la réserve cardiaque. Cet examen, pourrait potentiellement remplacer la ventriculographie isotopique avec l'ajout d'information sur la réserve métabolique cardiaque en plus de la fraction d'éjection ventriculaire gauche.

Les nouvelles stratégies thérapeutiques utilisent de plus en plus un mélange de techniques ou d'approches, que ce soit de la radiochimiothérapie (chimiothérapie concomitante avec la radiothérapie) (Sun et al., 2011; Yoshikawa et al., 2009) ou les nouvelles générations de classes thérapeutiques comme les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs des topoisomérases, les

inhibiteurs des protéines kinases et les inhibiteurs de poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) couplés aux thérapies conventionnelles. Comme exemple prometteur, pour le cancer du sein triple négatif (oestrogène, progestérone et HER-2 négatifs), on suggère l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme PARP I impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN, combiné à la chimiothérapie gemcitabine et carboplatine (O'Shaughnessy et al., 2011). L'imagerie moléculaire TEP au ^{18}F -FDG offre le potentiel de déterminer la réponse tumorale face au traitement, que ce soit en préclinique ou en clinique.

Chapitre 7. Conclusion

Ce projet de doctorat avait pour objectif de développer des outils quantitatifs pour le suivi des traitements du cancer du sein et de leurs effets cardiotoxiques à l'aide de l'imagerie dynamique TEP/TDM (clinique) et TEP (préclinique). L'analyse cinétique en TEP dynamique permet l'évaluation de paramètres biologiques *in vivo* tels la perfusion sanguine, la consommation en oxygène ainsi que l'activité métabolique de substrats énergétiques. Ces paramètres peuvent être utilisés aussi bien pour caractériser la réponse tumorale à la chimiothérapie que l'adaptation cardiaque aux effets secondaires néfastes qui peuvent en résulter. L'utilisation d'analyses cinétiques en TEP permet de caractériser *in vivo* des voies biologiques. L'utilisation de la fonction d'entrée dérivée de l'image simplifie les procédures lors d'examens cliniques.

Le premier article de cette thèse a permis de mettre au point des techniques d'analyse cinétique qui utilisent la fonction d'entrée d'un radiotracer dérivée de l'image dynamique avec l'utilisation de ^{11}C -acétate, ^{18}F -FTHA et ^{18}F -FDG en imagerie clinique. Des corrections de contamination radioactive externe (épanchement) et d'effet de volume partiel ont été nécessaires pour standardiser l'analyse cinétique et la rendre quantitative dans les analyses musculaires fémorales et cérébrales. Le développement de mires dynamiques reflétant l'injection d'un radiotracer dans le système sanguin a permis la validation des résultats quantitatifs obtenus lors des études cliniques.

Le deuxième article a évalué un nouveau radiotracer pour l'étude du myocarde. Le ^{11}C -acétoacétate, un corps cétonique qui peut servir de substrat énergétique, a été comparé au ^{11}C -acétate, un radiotracer de recherche fréquemment utilisé en imagerie cardiaque TEP. L'utilisation de ^3H -acétate et ^{14}C -acétoacétate a permis d'élucider la cinétique de ces traceurs et de leurs principaux métabolites ($^3\text{H}_2\text{O}$ et $^{14}\text{CO}_2$) dans le compartiment sanguin, ainsi que la captation mitochondriale cardiaque reflétant la consommation en oxygène. L'introduction du ^{11}C -acétoacétate comme nouveau radiotracer cardiaque TEP ouvre la voie à l'étude de la cinétique des corps cétoniques au niveau du métabolisme cardiaque, un sujet qui jusqu'à maintenant a été très peu considéré en imagerie cardiaque.

Le dernier article rapporté dans cette thèse porte sur l'intégration d'un modèle qui évalue la réserve cardiaque de perfusion et la consommation en oxygène. Un modèle de cardiomyopathie a

été établi à l'aide d'un agent chimiothérapeutique contre le cancer du sein, la doxorubicine, reconnue comme étant cardiotoxique. Un protocole de repos/effort a permis d'évaluer la capacité d'augmentation de perfusion et de consommation en oxygène par le cœur. La démonstration d'une réserve cardiaque réduite chez le rongeur traité à la doxorubicine fournit une information additionnelle pour caractériser la cardiotoxicité qui, jusqu'à maintenant, se limitait généralement à l'évaluation de la fraction d'éjection ventriculaire gauche.

Finalement, la conclusion de la dernière section de cette thèse rapporte des travaux effectués en continuité avec le thème de développement des outils d'imagerie TEP quantitatifs en vue de caractériser la cardiotoxicité sous chimiothérapie. Trois projets ont été décrits dans cette section.

Le premier projet porte sur la mise au point de méthodes peu invasives pour mesurer la fonction d'entrée avec l'utilisation d'un compteur microvolumétrique sanguin externe chez le rat. Lorsque la fonction d'entrée est nécessaire dans une analyse pharmacocinétique au ^{18}F -FDG, la collecte de sang de l'artère caudale avec MBC est une alternative. Cette méthode s'avère particulièrement utile pour les études longitudinales où les analyses biochimiques d'échantillons sanguins sont nécessaires.

Le deuxième projet explore l'utilisation de l'IRM et de son agent de contraste le Gd-DTPA pour mesurer la fonction d'entrée du ^{18}F -FDG lors d'analyse pharmacocinétique de la consommation de glucose. La co-injection d'un mélange de Gd-DTPA et de ^{18}F -FDG, analysée via des prélèvements plasmatiques artériels dans le temps, a permis par traitement mathématique de convertir la fonction d'entrée artérielle obtenue par le Gd-DTPA en fonction d'entrée artérielle du ^{18}F -FDG. Cette expérience basée sur l'analyse de la fonction d'entrée de la concentration d'agent de contraste Gd-DTPA utilisée en IRM pourrait réduire les prélèvements sanguins lorsqu'elle serait utilisée en IRM dynamique pour des analyses pharmacocinétiques au ^{18}F -FDG en imagerie TEP dynamique réalisées chez le même sujet.

Le troisième projet porte sur l'évaluation simultanée oncologique et cardiologique chez la souris, de la réponse aux traitements à la doxorubicine et de la cardiotoxicité associés à ces traitements. L'imagerie TEP dynamique du ^{11}C -acétoacétate et du ^{18}F -FDG permet d'évaluer la perfusion myocardique, la consommation d'oxygène, l'activité glycolytique du cœur et des tumeurs ainsi que la fraction d'éjection ventriculaire gauche dans ce modèle de souris.

L'évaluation en cours de cette nouvelle stratégie simultanée d'imagerie pourrait conduire à l'évaluation de nouveaux traitements, de nouvelles modalités de traitements de chimiothérapie ainsi que de nouvelles approches de cardioprotection.

Le développement de ces nouveaux outils d'analyse TEP pour l'évaluation de la cardiotoxicité lors de traitements du cancer du sein permettra de mieux comprendre la relation entre les altérations métaboliques, la perfusion myocardique et la consommation en oxygène en lien avec la diminution de la fraction d'éjection.

L'analyse quantitative en imagerie moléculaire permet de décrire de façon plus précise et plus rigoureuse les observations faites en recherche. L'exploitation d'outils quantitatifs, robustes et reproductibles facilite l'analyse des données en imagerie TEP moléculaire et raffermi les conclusions qu'on peut tirer des résultats. L'usage grandissant des traitements de chimiothérapie sur une population vieillissante amène plusieurs effets secondaires et la cardiotoxicité qui lui est associée est un phénomène préoccupant. L'imagerie moléculaire peut, en synergie avec les autres disciplines médicales, améliorer la qualité de vie de la population et fournir des outils pour augmenter les connaissances fondamentales.

Remerciements

Merci à mes deux directeurs de recherche, François Bénard et Roger Lecomte pour leur précieuse collaboration et leur soutien constant.

Merci aux Dr André C. Carpentier, Dr Stephen C. Cunnane et Dr Eric Turcotte pour leur soutien dans les études cliniques et fondamentales.

Merci à Jacques A. Rousseau pour son professionnalisme et son cœur à l'ouvrage.

Merci aux technologues du Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke et plus particulièrement à Jorge Rijo, Jocelyne Roy-Fontaine et Esteban Espinosa pour leur collaboration dans l'expérimentation clinique.

Merci au personnel du Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke et plus particulièrement à Sébastien Tremblay, René Ouellet, Réjean Langlois et Serge Rodrigue pour leur aide.

Un merci particulier à tous ceux qui ont travaillé avec moi durant mon passage au doctorat : Véronique Dumulon-Perreault, Suzanne Gascon, Eric Poulin, Mélanie Archambault, Sébastien Labbé, Johanne Provencher, Chantal Langevin, Laurent Hubert, Eric Lavallée et Caroline Mathieu.

Merci à Isabel Rusin pour sa rigueur et son apport significatif à cet ouvrage.

Références bibliographiques

- Agostini, D., Verberne, H. J., Hamon, M., Jacobson, A. F. et Manrique, A. (2008). Cardiac 123I-MIBG scintigraphy in heart failure. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging*, 52(4), 369-377.
- Aide, N., Desmonts, C., Beauregard, J. M., Beyer, T., Kinross, K., Roselt, P. et al. (2010). High throughput static and dynamic small animal imaging using clinical PET/CT: Potential preclinical applications. *European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging*, 37(5), 991-1001.
- Alessio, A. M., Kinahan, P. E., Cheng, P. M., Vesselle, H. et Karp, J. S. (2004). PET/CT scanner instrumentation, challenges, and solutions. *Radiologic Clinics of North America*, 42(6), 1017-1032.
- Andrieu-Abadie, N. (2004). [Cardiotoxicity of anthracyclines: Mechanisms and pharmacologic targets for prevention]. *Thérapie*, 59(1), 121-126.
- Beer, A. J., Haubner, R., Wolf, I., Goebel, M., Luderschmidt, S., Niemeyer, M. et al. (2006). PET-based human dosimetry of 18F-galacto-RGD, a new radiotracer for imaging alpha v beta3 expression. *Journal of Nuclear Medicine*, 47(5), 763-769.
- Bentourkia, M., Croteau, E., Langlois, R., Aliaga, A., Cadorette, J., Benard, F. et al. (2002). Cardiac studies in rats with ¹¹C-acetate and PET: A comparison with ¹³N-ammonia. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 49(5), 2322-2327.
- Bentourkia, M. (2006). Kinetic modeling of PET-FDG in the brain without blood sampling. *Computerized Medical Imaging & Graphics*, 30(8), 447-451.
- Bouchardy, C., Fioretta, G., Rapiti, E., Verkooijen, H. M., Rapin, C. H., Schmidlin, F. et al. (2008). Recent trends in prostate cancer mortality show a continuous decrease in several countries. *International Journal of Cancer*, 123(2), 421-429.

- Buck, A., Wolpers, H. G., Hutchins, G. D., Savas, V., Mangner, T. J., Nguyen, N. et al. (1991). Effect of carbon-11-acetate recirculation on estimates of myocardial oxygen consumption by PET.[see comment]. *Journal of Nuclear Medicine*, 32(10), 1950-1957.
- Checkley, D., Tessier, J. J., Kendrew, J., Waterton, J. C. et Wedge, S. R. (2003). Use of dynamic contrast-enhanced MRI to evaluate acute treatment with ZD6474, a VEGF signalling inhibitor, in PC-3 prostate tumours. *British Journal of Cancer*, 89(10), 1889-1895.
- Chen, K., Bandy, D., Reiman, E., Huang, S. C., Lawson, M., Feng, D. et al. (1998). Noninvasive quantification of the cerebral metabolic rate for glucose using positron emission tomography, 18F-fluoro-2-deoxyglucose, the patlak method, and an image-derived input function. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18(7), 716-723.
- Cherry, S., Sorensen, J. et Phelps, M. E. (2003). Physics in Nuclear Medicine. Édité par Saunders A. 3^{ième} édition, Pennsylvanie, Philadelphia.
- Choi, Y., Hawkins, R.A., Huang, S.C. et al. (1991) Parametric images of myocardial metabolic rate of glucose generated from dynamic cardiac PET and 2-(¹⁸F)Fluoro-2-deoxy-d-glucose studies. *Journal of Nuclear Medicine* 32,733-738
- Croteau, E., Benard, F., Bentourkia, M., Rousseau, J., Paquette, M. et Lecomte, R. (2004). Quantitative myocardial perfusion and coronary reserve in rats with ¹³N-ammonia and small animal PET: Impact of anesthesia and pharmacologic stress agents. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(11), 1924-1930.
- Croteau, E., Benard, F., Cadorette, J., Gauthier, M. E., Aliaga, A., Bentourkia, M. et al. (2003). Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(10), 1655-1661.
- Croteau, E., Lavalley, E., Labbe, S. M., Hubert, L., Pifferi, F., Rousseau, J. A. et al. (2010). Image-derived input function in dynamic human PET/CT: Methodology and validation with ¹¹C-acetate and ¹⁸F-fluorothioheptadecanoic acid in muscle and ¹⁸F-fluorodeoxyglucose in brain. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37(8), 1539-1550.

- Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S. et al. (2011). Brain fuel metabolism, aging, and alzheimer's disease. *Nutrition*, 27(1), 3-20.
- de Dreuille, O., Maszelin, P., Foehrenbach, H., Bonardel, G. et Gaillard, J. F. (2002). Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *Radiodiagnostic - Principes et techniques d'imagerie*, 35-310-A-10, 1-22.
- de Kemp, R. A., Epstein, F. H., Catana, C., Tsui, B. M. et Ritman, E. L. (2010). Small-animal molecular imaging methods. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(Suppl 1), 18S-32S.
- de Langen, A. J., van den Boogaart, V. E., Marcus, J. T. et Lubberink, M. (2008). Use of H₂(15)O-PET and DCE-MRI to measure tumor blood flow. *Oncologist*, 13(6), 631-644.
- DeGrado, T. R., Bergmann, S. R., Ng, C. K. et Raffel, D. M. (2000). Tracer kinetic modeling in nuclear cardiology. *Journal of Nuclear Cardiology*, 7(6), 686-700.
- Dumouchel, T., Selivanov, V. V., Cadorette, J., Lecomte, R. et de Kemp, R. A. (2009). Reconstructed image resolution of the LabPET small animal scanner measured using simulated partial volume effects. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 56(5), 2689-6
- Dunnwald, L. K., Gralow, J. R., Ellis, G. K., Livingston, R. B., Linden, H. M., Specht, J. M. et al. (2008). Tumor metabolism and blood flow changes by positron emission tomography: Relation to survival in patients treated with neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(27), 4449-4457.
- Eby, P. R., Partridge, S. C., White, S. W., Doot, R. K., Dunnwald, L. K., Schubert, E. K. et al. (2008). Metabolic and vascular features of dynamic contrast-enhanced breast magnetic resonance imaging and (15)O-water positron emission tomography blood flow in breast cancer. *Academic Radiology*, 15(10), 1246-1254.
- Elbl, L., Hrstkova, H., Tomaskova, I., Blazek, B. et Michalek, J. (2005). Long-term serial echocardiographic examination of late anthracycline cardiotoxicity and its prevention by dexrazoxane in paediatric patients. *European Journal of Pediatrics*, 164(11), 678-684.

- Escudier, B., Cosaert, J. et Pisa, P. (2008). Bevacizumab: Direct anti-VEGF therapy in renal cell carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 8(10), 1545-1557.
- Evelhoch, J. L., LoRusso, P. M., He, Z., DelProposto, Z., Polin, L., Corbett, T. H. et al. (2004). Magnetic resonance imaging measurements of the response of murine and human tumors to the vascular-targeting agent ZD6126. *Clinical Cancer Research*, 10(11), 3650-3657.
- Fang, Y. H. et Muzic, R. F., Jr (2008). Spillover and partial-volume correction for image-derived input functions for small-animal 18F-FDG PET studies. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(4), 606-614.
- Feng, D., Wong, K. P., Wu, C. M. et Siu, W. C. (1997). A technique for extracting physiological parameters and the required input function simultaneously from PET image measurements: Theory and simulation study. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 1(4), 243-254.
- Freedman, N. M., Sundaram, S. K., Kurdziel, K., Carrasquillo, J. A., Whatley, M., Carson, J. M. et al. (2003). Comparison of SUV and patlak slope for monitoring of cancer therapy using serial PET scans. *European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging*, 30(1), 46-53.
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727-741.
- Goertzen, A. L., Bao, Q., Bergeron, M., Blankemeyer, E., Blinder, S., Casadas, M. et al. (2010). NEMA NU4-2008 comparison of preclinical PET systems. *Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference, Knoxville, TN, 30 octobre – 6 novembre 2010*.
- Hatem, S. (2007). Insuffisance cardiaque : que peut-on encore attendre de la recherche fondamentale ?. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 56(4), 151-153.
- Herrero, P., Dence, C. S., Sharp, T. L., Welch, M. J. et Gropler, R. J. (2004). Impact of reversible trapping of tracer and the presence of blood metabolites on measurements of myocardial

- glucose utilization performed by PET and 18F-fluorodeoxyglucose using the patlak method. *Nuclear Medicine & Biology*, 31(7), 883-892.
- Hooning, M. J., Botma, A., Aleman, B. M., Baaijens, M. H., Bartelink, H., Klijn, J. G. et al. (2007). Long-term risk of cardiovascular disease in 10-year survivors of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(5), 365-375.
- Ikoma, Y., Watabe, H., Shidahara, M., Naganawa, M. et Kimura, Y. (2008). PET kinetic analysis: Error consideration of quantitative analysis in dynamic studies. *Annals of Nuclear Medicine*, 22(1), 1-11.
- Jan, F. (2005). *Cardiologie*. Édité par Masson. 2^{ième} édition. Paris. France.
- Juilliere, Y. et Delahaye, D. F. (2009). Insuffisance cardiaque de l'adulte. *Revue du Praticien*, 59(2), 249-257.
- Keyes, J. W., Jr (1995). SUV: Standard uptake or silly useless value?. *Journal of Nuclear Medicine*, 36(10), 1836-1839.
- Kimura, Y., Naganawa, M., Shidahara, M., Ikoma, Y. et Watabe, H. (2007). PET kinetic analysis --pitfalls and a solution for the logan plot. *Annals of Nuclear Medicine*, 21(1), 1-8.
- Korvald, C., Elvenes, O. P. et Myrmed, T. (2000). Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*, 278(4), H1345-51.
- Kreutzkamp, B. (2005). [Mammography screening. breast cancer mortality reduction by one fourth]. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 28(9), 330-331.
- Labbe, S. M., Croteau, E., Grenier-Larouche, T., Frisch, F., Ouellet, R., Langlois, R. et al. (2011a). Normal postprandial nonesterified fatty acid uptake in muscles despite increased circulating fatty acids in type 2 diabetes. *Diabetes*, 60(2), 408-415.
- Labbe, S. M., Grenier-Larouche, T., Croteau, E., Normand-Lauziere, F., Frisch, F., Ouellet, R. et al. (2011b). Organ-specific dietary fatty acid uptake in humans using positron emission

- tomography coupled to computed tomography. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism*, 300(3), E445-53.
- Laforest, R., Sharp, T. L., Engelbach, J. A., Fettig, N. M., Herrero, P., Kim, J. et al. (2005). Measurement of input functions in rodents: Challenges and solutions. *Nuclear Medicine & Biology*, 32(7), 679-685.
- Lee H.B., and Blaurock M.D. (1985) Blood volume in the rat. *Journal of Nuclear Medicine*. 25, 72-76
- Libersa, C., Gautier, S., Said, N. A., Ferez, L. et Caron, J. (2004). Insuffisances cardiaques d'origine médicamenteuse (en dehors des anthracyclines). *Thérapie*, 59(1), 127-142.
- Liu, S. (2009). Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -targeted radiotracers: Maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjugate Chemistry*, 20(12), 2199-2213.
- Logan, J. (2000). Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers. *Nuclear Medicine & Biology*, 27(7), 661-670.
- Logan, J., Alexoff, D. et Kriplani, A. (2007). Simplifications in analyzing positron emission tomography data: Effects on outcome measures. *Nuclear Medicine & Biology*, 34(7), 743-756.
- Logan, J., Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wang, G. J., Ding, Y. S. et Alexoff, D. L. (1996). Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 16(5), 834-840.
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S. et Stanley, W. C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews*, 90(1), 207-258.
- Mankoff, D. A. (2008). Molecular imaging as a tool for translating breast cancer science. *Breast Cancer Research*, 10(Suppl 1), S3.

- Maroy, R., Boisgard, R., Comtat, C., Jégo, B., Fontyn, Y., Jan, S. et al. (2010). Quantitative organ time activity curve extraction from rodent PET images without anatomical prior. *Medical Physics*, 37(4), 1507-1517.
- McGrath DM, Bradley DP, Tessier JL, Lacey T, Taylor CJ, Parker GJ. (2009). Comparison of model-based arterial input functions for dynamic contrast-enhanced MRI in tumor bearing rats. *Magnetic Resonance in Medicine*. 61:1173-1184
- Menard, S. L., Croteau, E., Sarrhini, O., Gelinas, R., Brassard, P., Ouellet, R. et al. (2010). Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism*, 298(5), E1049-57.
- Metz, S., Ganter, C., Lorenzen, S., van Marwick, S., Herrmann, K., Lordick, F. et al. (2010). Phenotyping of tumor biology in patients by multimodality multiparametric imaging: Relationship of microcirculation, α v β 3 expression, and glucose metabolism. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(11), 1691-1698.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. et Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185-229.
- Morris, A. A. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(2), 109-121.
- Morrison, A. R. et Sinusas, A. J. (2010). Advances in radionuclide molecular imaging in myocardial biology. *Journal of Nuclear Cardiology*, 17(1), 116-134.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Batkai, S., Kashiwaya, Y., Hasko, G., Liaudet, L. et al. (2009a). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*, 296(5), H1466-83.

- Munk OL, Keiding S, Bass L. (2008). A method to estimate dispersion in sampling catheters and to calculate dispersion-free blood time-activity curves. *Medical Physics*. 35:3471-3481
- Nahrendorf, M., Keliher, E., Panizzi, P., Zhang, H., Hembrador, S., Figueiredo, J. L. et al. (2009a). 18F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis. *Jacc: Cardiovascular Imaging*, 2(10), 1213-1222.
- Nahrendorf, M., Sosnovik, D. E., French, B. A., Swirski, F. K., Bengel, F., Sadeghi, M. M. et al. (2009b). Multimodality cardiovascular molecular imaging, part II. *Circulation. Cardiovascular imaging*, 2(1), 56-70.
- Nugent, S., Croteau, E., Pifferi, F., Fortier, M., Tremblay, S., Turcotte, E. et al. (2011). Brain and systemic glucose metabolism in the healthy elderly following fish oil supplementation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, epub 25 juillet 2011
- Ogden, R. T. (2003). Estimation of kinetic parameters in graphical analysis of PET imaging data. *Statistics in Medicine*, 22(22), 3557-3568.
- Ohshima, S., Petrov, A., Fujimoto, S., Zhou, J., Azure, M., Edwards, D. S. et al. (2009). Molecular imaging of matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic plaques of mice deficient in apolipoprotein e or low-density-lipoprotein receptor. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(4), 612-617.
- O'Shaughnessy, J., Osborne, C., Pippen, J. E., Yoffe, M., Patt, D., Rocha, C. et al. (2011). Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 364(3), 205-214.
- Pellerin, M., Tankeelov, T.E., Lepage, M. (2007). Incorporating Contrast Agent Diffusion Into the Analysis of DCE-MRI Data. *Magnetic Resonance in Medicine* 58:1124-1134
- Perez, E. A., Suman, V. J., Davidson, N. E., Kaufman, P. A., Martino, S., Dakhil, S. R. et al. (2004). Effect of doxorubicin plus cyclophosphamide on left ventricular ejection fraction in patients with breast cancer in the north central cancer treatment group N9831 intergroup adjuvant trial. *Journal of Clinical Oncology*, 22(18), 3700-3704.

- Pichon, M. F., Cvitkovic, F., Hacene, K., Delaunay, J., Lokiec, F., Collignon, M. A. et al. (2005). Drug-induced cardiotoxicity studied by longitudinal B-type natriuretic peptide assays and radionuclide ventriculography. *In Vivo*, 19(3), 567-576.
- Pifferi, F., Tremblay, S., Croteau, E., Fortier, M., Tremblay-Mercier, J., Lecomte, R. et al. (2011). Mild experimental ketosis increases brain uptake of ^{11}C -acetoacetate and ^{18}F -fluorodeoxyglucose: A dual-tracer PET imaging study in rats. *Nutrition Neuroscience*, 14(2), 51-58.
- Prevost, S., Lavallee, E., Croteau, E., Hubert, L., Rijo, J., Lecomte, R. et al. (2003). Partial volume effects on SUV measurements: Impact of acquisition methods, reconstruction modes and image filtering for 2 dedicated PET scanners. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(5), 985.
- Schmidt, K. C. et Turkheimer, F. E. (2002). Kinetic modeling in positron emission tomography. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, 46(1), 70-85.
- Shidahara, M., Ikoma, Y., Kershaw, J., Kimura, Y., Naganawa, M. et Watabe, H. (2007). PET kinetic analysis: Wavelet denoising of dynamic PET data with application to parametric imaging. *Annals of Nuclear Medicine*, 21(7), 379-386.
- Sinusas, A. J., Bengel, F., Nahrendorf, M., Epstein, F. H., Wu, J. C., Villanueva, F. S. et al. (2008). Multimodality cardiovascular molecular imaging, part I. *Circulation. Cardiovascular Imaging*, 1(3), 244-256.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D. et al. (1977). The [^{14}C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of neurochemistry*, 28(5), 897-916.
- Soret, M., Bacharach, S. L. et Buvat, I. (2007). Partial-volume effect in PET tumor imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(6), 932-945.

- Squires, J. E., Sun, J., Caffrey, J. L., Yoshishige, D. et Mallet, R. T. (2003). Acetoacetate augments beta-adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*, 284(4), H1340-7.
- Stanley, W. C., Recchia, F. A. et Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological Reviews*, 85(3), 1093-1129.
- Subramanian, L., Youssef, S., Bhattacharya, S., Kenealey, J., Polans, A. S. et van Ginkel, P. R. (2010). Resveratrol: Challenges in translation to the clinic--a critical discussion. *Clinical Cancer Research*, 16(24), 5942-5948.
- Sun, W., Metz, J. M., Gallagher, M., O'Dwyer, P. J., Giantonio, B., Whittington, R. et al. (2011). Two phase I studies of concurrent radiation therapy with continuous-infusion 5-fluorouracil plus epirubicin, and either cisplatin or irinotecan for locally advanced upper gastrointestinal adenocarcinomas. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 67(3), 621-627.
- Surti, S., Karp, J. S. et Kinahan, P. E. (2004). PET instrumentation. *Radiologic Clinics of North America*, 42(6), 1003-1016.
- Tantawy, M. N. et Peterson, T. E. (2010). Simplified [18F]FDG image-derived input function using the left ventricle, liver, and one venous blood sample. *Molecular Imaging*, 9(2), 76-86.
- Tuunanen, H., Ukkonen, H. et Knuuti, J. (2008). Myocardial fatty acid metabolism and cardiac performance in heart failure. *Current Cardiology Reports*, 10(2), 142-148.
- van den Hoff, J., Burchert, W., Borner, A. R., Fricke, H., Kuhnel, G., Meyer, G. J. et al. (2001). [1-(11)C]acetate as a quantitative perfusion tracer in myocardial PET. *Journal of Nuclear Medicine*, 42(8), 1174-1182.
- van den Hoff, J., Burchert, W., Wolpers, H. G., Meyer, G. J. et Hundeshagen, H. (1996). A kinetic model for cardiac PET with [1-carbon-11]-acetate. *Journal of Nuclear Medicine*, 37(3), 521-529.
- Veech, R. L. (2004). The therapeutic implications of ketone bodies: The effects of ketone bodies in pathological conditions: Ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and

mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 70(3), 309-319.

Wallace, D. C., Fan, W. Procaccio, V. (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annual Review of Pathology*, 5297-348.

Wallace, K. B. (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology*, 93(3), 105-115.

Watabe, H., Ikoma, Y., Kimura, Y., Naganawa, M. et Shidahara, M. (2006). PET kinetic analysis--compartmental model. *Annals of Nuclear Medicine*, 20(9), 583-588.

Yoshikawa, T., Tsuburaya, A., Hirabayashi, N., Yoshida, K., Nagata, N., Koderu, Y. et al. (2009). A phase I study of palliative chemoradiation therapy with paclitaxel and cisplatin for local symptoms due to an unresectable primary advanced or locally recurrent gastric adenocarcinoma. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 64(6), 1071-1077.

Yoshinaga, K. et Tamaki, N. (2007). Imaging myocardial metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(1), 52-59.

Zhou, Y., Ye, W., Brasic, J. R. et Wong, D. F. (2010). Multi-graphical analysis of dynamic PET. *NeuroImage*, 49(4), 2947-2957.

Annexe I

Congrès International de la société de médecine nucléaire « SNM Annual meeting 2011 », San Antonio, États-Unis, du 4 au 8 juin 2011

A non-invasive arterial blood sampling method to obtain input function in rat

Croteau Etienne, Poulin Eric, Tremblay Sébastien, Dumulon-Perreault Véronique, Gascon Suzanne, Benard Francois, Lepage Martin, Lecomte Roger

OBJECTIVES:

Kinetic modeling of small animal dynamic PET data requires the radiotracer input function (IF). Arterial blood sampling is the gold standard for IF determination, but this often requires invasive surgical procedures which are inappropriate for follow-up studies. One alternative to this problem would be to draw blood, either manually or using an automatic microvolumetric blood counter, from a needle placed non-invasively in the tail artery.

Methods:

Animal experiments were conducted in male Fischer rats (280 ± 60 g). One group (n=3) was used to correlate automatic against manual sampling from both canula in the femoral arteries. Two more groups of rats were used to assess manual (n=5) and automatic (n=5) sampling from the tail artery. Each group was injected through a caudal vein with 25 MBq of FDG and a 45 minutes list mode PET data set was acquired. The myocardial metabolic rate of glucose (MMRG) was obtained using a PATLAK graphical analysis and a three compartment model.

Results:

Manual and automatic IFs derived simultaneously from the femoral arteries yielded similar blood curves (paired T-test $p=0.11$). Similar results were also observed when drawing blood manually or with the microvolumetric counter from the tail artery (unpaired T-test $p=0.55$). However, IFs derived from the femoral and caudal arteries were different, yielding MMRG values of 13.6 ± 4.9 vs 27.1 ± 8.7 $\mu\text{mol}/100$ g/min, respectively. Further studies are underway to compare both sampling sites simultaneously since the physiological state of the animals could explain this discrepancy.

Conclusion:

Non-invasive tail artery blood sampling was demonstrated to obtain IF with minimal impact on animal physiological integrity. This method would be appropriate for repeated follow up studies in the same animal, as it is often required for therapy assessment of cancer or heart disease models.

Annexe II

Congrès International de Résonance Magnétique 2011 ‘SMRM 2011’

Feasibility of dual pharmacokinetic modeling using Gd-DTPA/MRI and ¹⁸F-FDG/PET

Poulin Eric, Croteau Etienne, Lebel Réjean, Tremblay Luc, Lecomte Roger, Bentourkia M’hamed, Lepage Martin.

Introduction

MRI-PET bimodal imaging is already a reality in fundamental and clinical research. Reaching the full potential of such dual imaging approaches for broader clinical acceptance may be through new methodologies that take advantages of one modality to compensate for the limitations of the other. The arterial input function (AIF) is commonly used for several types of MRI and PET pharmacokinetic analyses, but measurement of the AIF remains a challenge for both modalities. The most commonly used MRI contrast agent, Gd-DTPA, and PET radiotracer, ¹⁸F-FDG, both are subjected to extravasation and excretion, and ¹⁸F-FDG can be further internalized into cells. The aim of our study was to evaluate the correspondence between the AIF derived from MRI and PET, and to determine whether the AIF obtained by one modality can be converted into the AIF for the other modality. Such a conversion would be particularly useful for pharmacokinetic modeling of data acquired with both imaging modalities.

Methods

Fisher rats (n = 7) were scanned in a μ PET scanner during an intravenous co-injection of ¹⁸F-FDG and Gd-DTPA to evaluate the correspondence between the two AIFs. Blood samples were collected manually at several time points and the blood concentration of ¹⁸F-FDG and Gd-DTPA was determined with a gamma counter and by induced coupled plasma mass spectroscopy, respectively. These AIF curves were fitted with a 4-parameter bi-exponential model [Tofts et al. MRM 17, 357-367 (1991)] after normalization to the AIF maximum value. The parameters represent a fast and a slow decay, each with independent amplitude. To compare ¹⁸F-FDG and Gd-DTPA AIF curves, a Student’s t-test was performed to compare each fitting parameter and the area under the curve (AUC). The relationship between the injected dose normalized by the weight of the rat and the maximum value of the AIF was then investigated. We report the myocardial metabolic rates of glucose (MMRGlc) in the rats using both ¹⁸F-FDG AIF and an AIF converted from the Gd-DTPA AIF.

Results

Fig. 1a shows the Gd-DTPA and ¹⁸F-FDG normalized AIF. The two curves are not identical; the fast decay parameters are similar while the slow decay and amplitude parameters were statistically different ($p < 0.05$). Phosphorylated ¹⁸F-FDG accumulates in cells and is known to return more slowly to the vasculature. We noted that the ratios between the MRI and PET AIF parameters were similar in all rats. Using these ratios, Fig. 1b shows that it was possible to convert the Gd-DTPA AIF into a ¹⁸F-FDG AIF, and vice versa. Indeed, there was no statistical

difference between experimental curves and converted curves. In other words, a Gd-DTPA AIF can accurately predict the 18F-FDG AIF. Furthermore, a linear relationship was found between normalized injection dose and the maximum value of the AIF for both modalities. Therefore, no blood sample would be required for the conversion from Gd-DTPA to 18F-FDG AIF, and vice versa. Fig. 2 shows (a) AUC values for experimental Gd-DTPA AIF and the corresponding AIF converted from the 18F-FDG AIF renormalized using the injected dose, and (b) AUC values for experimental 18F-FDG AIF and the corresponding AIF converted from the Gd-DTPA AIF renormalized using the injected dose. No significant statistical difference was found between AUC values for experimental and converted curves. This was also true for MMRGlc values.

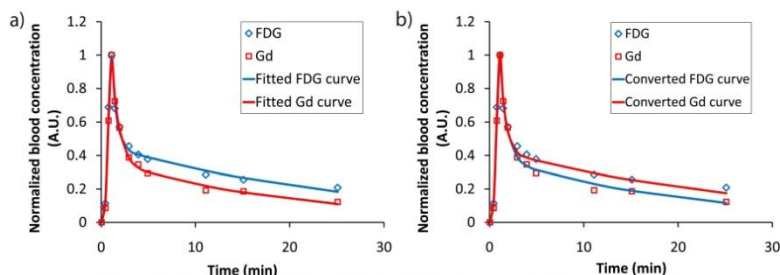


Fig. 1 (a) Normalized Gd and FDG AIF (b) Converted Gd and FDG AIF

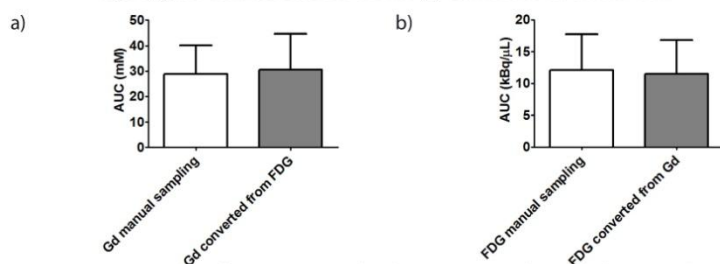


Fig. 2 (a) AUC values for experimental and FDG converted curves (b) AUC values for experimental and Gd converted curves

Conclusion

It is possible to convert the Gd-DTPA AIF obtained by manual blood sampling into a 18F-FDG AIF, and vice versa. The 18F-FDG AIF derived from the Gd-DTPA AIF can be used for PET pharmacokinetic modeling. This conversion and the relation between the injected dose and the maximal value of the AIF shown here suggest that it would be possible to perform dual kinetic modeling, using the reference region in MRI or an imaged-derived AIF in PET, without requiring calibration with blood samples.

Annexe III

Congrès International de Médecine Nucléaire 2011 'SNM 2011'

Simultaneous follow-up of tumor response to chemotherapy and cardiotoxicity in mice: a feasibility study

Gascon Suzanne, Croteau Etienne, Dumulon-Perreault Véronique, Tremblay Sébastien, Turcotte Eric, Lecomte Roger

OBJECTIVES:

A follow-up PET imaging protocol was designed to simultaneously monitor cardiotoxicity and tumor response to chemotherapy in a mouse model of breast cancer. It involves measurement of the heart and tumor glycolic activity with ^{18}F -FDG, assessment of myocardial perfusion and oxygen consumption with the radiolabeled ketone body ^{11}C -acetoacetate (AcAc), and cardiac function evaluation with FDG.

METHODS:

The study was conducted in Balb/c mice inoculated with murine breast cancer tumors (MC7-L1 and MC4-L2). Weekly Doxorubicin treatment (5 mg/kg) was initiated four weeks after tumor inoculation. The imaging sequence consisted of dynamic gated PET image acquisitions starting with a 20 min AcAc scan (50 MBq), followed by a 45 min FDG scan (20 MBq). Tumor and myocardial time-activity curves were fitted by kinetic compartmental models to extract glucose and oxygen consumption, and myocardial perfusion. Cardiac gated data were analyzed with standard clinical software.

RESULTS:

Tumor baseline glucose consumption was 11.4 ± 1.9 and 13.7 ± 3.3 $\mu\text{mol}/(100 \text{ g}/\text{min})$ for MC7-L1 and MC4-L2, respectively. A small decrease of tumor glycolytic activity in response to chemotherapy was noticed after 2 weeks of treatment. Baseline values for perfusion and cardiac oxygen consumption measured by AcAc were $2.0 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$ and $0.9 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$, respectively. The end-diastolic volume, end-systolic volume and left ventricle ejection fraction values were respectively $22.0 \pm 1.7 \mu\text{L}$, $4.0 \pm 0.5 \mu\text{L}$ and $80 \pm 2\%$ with FDG.

CONCLUSIONS:

Dynamic cardiac-gated PET imaging with AcAc and FDG can be used to assess myocardial perfusion and oxygen consumption, as well as glycolytic activity of tumors and heart in a mouse model, providing an efficient means for simultaneous monitoring of cardiotoxicity and tumor response to chemotherapy. This approach would be well suited for the assessment of new chemotherapeutic strategies.