

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉTECTION PRÉCOCE DE LA CARDIOTOXICITÉ DUE À LA DOXORUBICINE
CHEZ LE MINIPORC PAR IMAGERIE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE

CLÉMENCE BALOSETTI

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉTECTION PRÉCOCE DE LA CARDIOTOXICITÉ DUE À LA DOXORUBICINE CHEZ
LE MINIPORC PAR IMAGERIE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE

présenté par : BALOSETTI Clémence

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme VILLEMURE Isabelle, Ph. D., présidente

Mme PÉRIÉ-CURNIER Delphine, Doctorat, membre et directrice de recherche

M. CURNIER Daniel, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. HAFYANE Tarik, M. Sc., membre

DÉDICACE

« L'homme raisonnable s'adapte au monde; l'homme déraisonnable s'obstine à essayer d'adapter le monde à lui-même. Tout progrès dépend donc de l'homme déraisonnable. »

George Bernard Shaw

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord vers ma directrice de recherche, Delphine Périé-Curnier, pour sa confiance, sa patience, ses conseils tout au long du projet et pour son caractère passionné qui font d'elle une personne avec qui il est très agréable de travailler.

Je tiens ensuite à remercier Hélène Héon, vétérinaire au CR-CHUM, pour son aide précieuse dans l'élaboration du protocole animal, ainsi qu'à son équipe compétente ayant fortement contribué à la réussite de ce projet de maîtrise. Un grand merci également à Danielle Blain, technicienne IRM, et Johanne Therien, technicienne en échographie, pour leur temps et leur efficacité. Cela a été un plaisir de travailler auprès de ces agréables personnes professionnelles et motivantes.

Je remercie aussi mes co-auteurs pour leur temps et leur avis critique, Nagib Dahdah, Farida Cheriet, Matthias Friedrich, Hélène Héon et en particulier Daniel Curnier qui s'est montré intéressé et disponible tout au long du projet.

Je remercie également mon jury, Isabelle Villemure et Tarik Hafyane, pour avoir accepté de donner de leur temps afin d'évaluer mon travail.

Pour finir, je remercie chaleureusement ma famille et mes amis en France qui restent disponibles et me procurent un grand soutien malgré la distance qui nous sépare. A mes amis de Montréal, dont les étudiants des laboratoires A-630.5 et A-629.7 de Polytechnique Montréal, pour m'avoir supportée jusqu'au bout et pour avoir fait de cette maîtrise une expérience aussi agréable que formatrice. Je remercie tout particulièrement Mohamed Aissiou pour son aide précieuse, sa disponibilité, et son transfert de connaissance, ainsi qu'Anne-Laure Ménard pour son temps, ses judicieux conseils et nos conversations motivantes ! Enfin, merci aux étudiants du Département d'Anatomie par Radiologie de l'Université d'Auckland, Nouvelle-Zélande, pour leur soutien lors de cette phase critique que sont les dernières semaines de rédaction et de préparation à la soutenance.

RÉSUMÉ

Objectif : La chimiothérapie est une méthode qui a fait ses preuves quant à l'élimination de différents types de cancers. Cependant la cardiotoxicité associée reste sa plus grande barrière à la bonne santé à long terme des patients. Les jeunes patients recevant un haut dosage sont les plus touchés par cette cardiotoxicité, précoce ou retardée selon les cas. Cette étude vise à examiner la réaction précoce du myocarde à l'injection intraveineuse d'une haute dose de médicament anti-cancéreux chez un large modèle animal par IRM multiparamétrique (mpMRI).

Matériel et méthodes : Cinq miniporcs Yucatan femelles prépubères ont reçu 5 doses de doxorubicine ($75\text{mg}/\text{m}^2$) à trois semaines d'intervalles (dose cumulative totale de $375\text{mg}/\text{m}^2$) formant le groupe expérimental appelé groupe Doxo. Deux miniporcs ont reçu de la saline selon le même protocole, formant le groupe contrôle. Trois acquisitions d'images IRM et échocardiographiques ont été réalisées au cours du projet : la première avant la première injection (A1), la deuxième après la quatrième injection (A2, dose cumulative de $300\text{mg}/\text{m}^2$) et la troisième trois semaines après la dernière injection (A3). Des tests d'hématologie ont été réalisés pour vérifier la déficience de l'immunité due au traitement de chimiothérapie. Les données d'IRM ont été comparées entre les acquisitions et les groupes grâce à des ANOVA à une voie sur les rangs et incluaient le déplacement cumulatif de chaque point du contour myocardique, les aires ventriculaires, la longueur des ventricules, l'épaisseur des parois, la torsion du ventricule gauche, les valeurs cumulatives de contrainte et déformations selon von Mises, les temps de relaxation T1 (avant, T1pre, et après, T1post, l'injection d'un agent de contraste) et T2.

Résultats : Les miniporcs recevant la chimiothérapie ont souffert d'alopécie et de diarrhée pendant quelques jours après chaque injection. Les taux de globules blancs et de plaquettes ont chuté dans le groupe Doxo restant stable chez les miniporcs sains. Les fractions d'éjection et de raccourcissement ainsi que le flux aortique ont chuté lors de la dernière acquisition dans le groupe Doxo, ce qui n'a pas été noté chez les porcs sains. Les mesures d'aires, de longueurs, d'épaisseurs et de torsions calculées par IRM présentaient des courbes similaires mais dont l'amplitude changeait selon les groupes et les acquisitions. Les valeurs de contraintes et déformations ont diminué lors de la dernière acquisition en systole et fin de diastole. Les valeurs de T1pre ont

diminué avec le temps dans le groupe contrôle. Les valeurs de T1post ont diminué dans les deux groupes. Les valeurs de T2 ont diminué dans le groupe Doxo.

Conclusion : Le miniporc recevant un traitement de chimiothérapie selon le protocole clinique est un modèle approprié à l'étude des lésions cardiaques. Notre protocole IRM, utilisant conjointement la relaxométrie et le ciné-IRM, se révèle plus apte pour la détection précoce des changements structuraux cardiaques, induits par le traitement de chimiothérapie, que la méthode standard d'échocardiographie. Une telle méthode va pouvoir aider les cliniciens à personnaliser les interventions thérapeutiques selon la réaction de chaque patient.

Mots-clés : Cardiotoxicité. Doxorubicine. Miniporcs. IRM multiparamétrique. Ciné-IRM. Temps de relaxation. Fonction cardiaque.

ABSTRACT

Purpose: Chemotherapy has been proven to be the best way to eliminate several types of cancer. However, the associated cardiotoxicity is an important drawback to the long-term well-being of patients. Young patients receiving a high dosage are the most prone to develop this cardiotoxicity, which can occur either early or late after treatment. This study aims to investigate the early myocardial response to an intravenous injection of a high dosage of anticancer agent, using multiparametric MRI (mpMRI), in a large animal model.

Material & Methods: Five young female Yucatan minipigs received five doses of doxorubicine ($75\text{mg}/\text{m}^2$), one every three weeks (total cumulative dose of $375\text{mg}/\text{m}^2$), constituting the experimental group called Doxo group. Two minipigs received saline under the same protocol, constituting the control group. Three MRI and echocardiographic images acquisitions were performed: the first before the first injection (A1), the second after the fourth injection (A2, cumulative dose of $300\text{mg}/\text{m}^2$) and the third three weeks after the last injection (A3). Hematologic tests were performed to verify the immune deficiency due to chemotherapy. MRI data were compared between groups and acquisitions using one way ANOVA on ranks and included cumulative displacement of each point on the myocardial contour, ventricular areas, ventricular lengths, wall thicknesses, left ventricle torsion, cumulative values of von Mises stress and strain, relaxation times T1 (before, T1pre, and after, T1post, a contrast agent injection) and T2.

Results: Minipigs receiving chemotherapy suffered from alopecia and diarrhoea for some days after each injection. White blood cells and platelets rates decreased in the Doxo group while staying stable in the control group. The ejection fraction, the shortening fraction and the aortic blood flow decreased at A3 in the Doxo group but not in the control group. Similar curves were shown for MRI measurements of areas, lengths, thicknesses and LV torsion but their amplitude was different according to groups and acquisitions. Stress and strain values decreased at A3 in systole and end-diastole. T1 pre-gadolinium values decreased with time in the control group. T1 post-gadolinium values decreased in both groups with time. T2 values decreased in the Doxo group.

Conclusion: Using the clinical chemotherapy protocol in the minipig is a suitable model to study cardiac lesions. Our MRI protocol, using relaxometry together with cine-MRI, could be a more qualified method to detect early subtle structural changes due to chemotherapy than the echocardiography. Such a technique will help clinicians to personalise therapeutic interventions according to each patient's response.

Keywords: Cardiotoxicity, Doxorubicin, Minipig, Multiparametric MRI, Cine-MRI, Relaxation times, Cardiac function.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
LISTE DES ANNEXES	XVI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Anatomie et structure	3
1.1.1 Biologie et biochimie	5
1.2 Pathologies cardiaques : changements caractéristiques	8
1.2.1 Changements fonctionnels	8
1.2.2 Changements biologiques et structurels	9
1.3 Pathologies cardiaques : détection	10
1.3.1 L'électrocardiogramme (ECG).....	10
1.3.2 L'échocardiographie.....	11
1.4 Anthracyclines.....	15
1.4.1 Utilisation	15
1.4.2 Effets secondaires chez l'humain.....	16
1.5 Etudes antérieures de la cardiotoxicité des anthracyclines et justification du protocole animal	17
1.5.1 Effet de la doxorubicine sur le petit animal et le chien	17

1.5.2	Modèle porcin : avantages et réaction face à la doxorubicine	18
1.6	Imagerie par résonnance magnétique (IRM).....	19
1.6.1	Fonctionnement général	19
1.6.2	Qualité des images et artéfacts	27
1.6.3	Application cardiaque : Ciné-IRM.....	29
1.6.4	Application cardiaque : Relaxométrie.....	31
1.6.5	Application cardiaque : IRM de perfusion myocardique	32
CHAPITRE 2 ARTICLE 1 : EARLY DETECTION OF DOXORUBICIN CARDIOTOXICITY IN THE SWINE BY CARDIAC MAGNETIC RESONANCE IMAGING.....		33
2.1	Présentation de l'article.....	33
2.2	Early Detection of Doxorubicin Cardiotoxicity in the Swine by Cardiac Magnetic Resonance Imaging	33
2.2.1	Abstract	35
2.2.2	Background	37
2.2.3	Methods.....	39
2.2.4	Results	43
2.2.5	Discussion	47
2.2.6	Conclusion.....	52
2.2.7	Declarations.....	53
2.2.8	References	56
2.2.9	List of Figures	62
CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE		74
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		77
RÉFÉRENCES.....		79

ANNEXES	86
---------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 - Anatomie du myocarde – modifié de eureka.sante.vidal.fr	3
Figure 1.2 - Circulation sanguine – modifié de humananatomybody.info.....	4
Figure 1.3 - Muscle cardiaque	5
Figure 1.4 - Formation et agencement des fibres de collagènes –modifié de bionanotech2012.files.wordpress.com	6
Figure 1.5 - Fibres d'élastine, design au repos (en haut) et lors de l'étirement (en bas) – modifié de helpfromthedoctor.com	7
Figure 1.6 - Agrégat de protéoglycanes (à gauche) et molécule de protéoglycane unitaire (à droite)	7
Figure 1.7 - Positionnement des électrodes pour l'enregistrement d'un électrocardiogramme – tiré de boundless.com	11
Figure 1.8 - Tracé ECG –modifié de wikimedia	11
Figure 1.9 - Images échocardiographiques : mode M (à gauche); mode à deux dimensions (à droite) - tiré de wikimedia.....	12
Figure 1.10 - Perception de l'onde sonore en fonction du déplacement d'un objet. λ la longueur d'onde; v la vitesse de déplacement –modifié de chimix.com	13
Figure 1.11 - Image d'échographie Doppler de la valve mitrale (à gauche); échelle de couleur (à droite) représentant la vitesse et la direction du flux superposé à l'image échographique – modifié de wikipedia et sites.google.com/	14
Figure 1.12 - (a) Les spins des protons s'alignent au champ B_0 ; (b) aimantation résultante dans la direction et le sens de B_0 –modifié de imaios.com.....	20
Figure 1.13 - Relaxation longitudinale – tiré de imaios.com	22
Figure 1.14 - Relaxation transversale– tiré de imaios.com	22
Figure 1.15 - Séquence écho de spin – tiré de imaios.com – RF : onde radiofréquence, G_{sc} : gradient de coupe, G_{cp} : gradient de phase, G_{cf} : gradient de fréquence.	23

Figure 1.16 - Séquence d'inversion-récupération – tiré de imaios.com – RF : onde radiofréquence, Gss : gradient de coupe, Gpe : gradient de phase, Gfe : gradient de fréquence.....	24
Figure 1.17 - (a) Partie centrale de l'image dans l'espace K; (b) Image résultante lorsque seules les basses fréquences de l'espace K sont gardées; (c) Partie latérale de l'image du plan de Fourier; (d) Image résultante lorsque seules les hautes fréquences de l'espace K sont gardées – modifié de imaios.com.....	25
Figure 1.18 - Cartographie T2 (a) et T1 (b) à mi-hauteur des ventricules pour un même sujet, lors d'une même acquisition	26
Figure 1.19 - Illustration du phénomène d'aliasing. (a) Un champ de vue donné; (b) image résultante du champ du vue choisi – modifié de imaios.com	28
Figure 1.20 - Schématisation de la méthode de Gating Rétrospectif– modifié de imaios.com	30
Figure 1.21 - Plans de coupe usuels en imagerie cardiaque– modifié de centrallakesclinic.biz.....	31
Figure 2.1: Injection and acquisition protocol. IT: Initial Time of the study (after animal acclimation), FT: Final Time (day of euthanasia).....	62
Figure 2.2: Myocardial contours segmentation in our customized Matlab program. Curve 1: pericardium, curve 2: right ventricle, curve 3: left ventricle.....	64
Figure 2.3: Echocardiographic results including left ventricular ejection fraction (a), aortic flow velocity (b), left ventricle diameter in diastole (c), right ventricle diameter in diastole (d), pulmonary flow velocity €, myocardial performance index (f), E/E' lateral wall (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the lateral wall of the left ventricle) (g), and E/E' septum (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the interventricular septum) (h).....	65
Figure 2.4: Left and right ventricle areas (mm ²) along the cardiac cycle: beginning of systole (end- diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.	67
Figure 2.5: Septum, left ventricle and right ventricle thicknesses (mm) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.	68

Figure 2.6: Normalized torsion ($^{\circ}$) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at phase 1 and beginning of diastole (end-systole) around phase 17.	69
Figure 2.7: Left and right ventricle cumulative displacements (mm) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.	70
Figure 2.8: Mean cumulative strain values in systole (top) and in diastole (bottom) from one miniature swine at each acquisition time (A1, A2, A3).	71
Figure 2.9: Mean stress values during systole (top) and diastole (bottom) with 4 segments for the left ventricle (LV), 2 segments for the septum (SE) and 1 segment for the right ventricle (RV).	72
Figure 2.10: Mean T1 pre-gadolinium (ms), T1 post-gadolinium (ms) and T2 (ms) for the left ventricle of the doxorubicin group on the left and the control group on the right.	73

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACIA : Agence Canadienne d'inspection des aliments

CIPA : Comité Institutionnel de Protection des Animaux

CR-CHUM : Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal

ECG : Électrocardiogramme

FTIR : Fourier Transform Infrared Spectrometry

IRM : Imagerie par résonance magnétique

OD : Oreillette droite

OG : Oreillette gauche

T1 : Temps de relaxation longitudinal

T2 : Temps de relaxation transverse

VD : Ventricule droit

VG : Ventricule gauche

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Définition de la règle des 3R selon le Conseil Canadien de Protection des Animaux 87

INTRODUCTION

La chimiothérapie est un traitement hautement efficace du cancer qui consiste à injecter des doses d'anthracyclines sur une période variable de plusieurs mois. L'efficacité de la doxorubicine, le médicament le plus souvent utilisé, est toutefois entachée par son effet cardiotoxique. Une cardiotoxicité sévère peut mener à une insuffisance cardiaque, se traduisant par un muscle cardiaque plus large, plus épais ou plus rigide. Par conséquent, le cœur n'est plus capable de maintenir un rythme cardiaque et un flux sanguin adéquat pour subvenir aux besoins systémiques de l'organisme. Le manque d'outil de détection précoce et de suivi de l'évolution de cette cardiotoxicité reste un obstacle à la bonne santé de ces survivants de cancer.

A ce jour, la base des diagnostics cliniques se fonde sur des paramètres hémodynamiques, mesurés par échocardiographie principalement, illustrant la fonctionnalité du myocarde. L'évaluation des paramètres mécaniques propres au muscle cardiaque, grâce à l'imagerie, pourrait permettre de poser un diagnostic précoce d'une dysfonction du muscle cardiaque précédant l'apparition d'une incompétence fonctionnelle.

Plusieurs études menées sur des survivants de cancer par échocardiographie ou IRM montrent les effets à long terme de leur traitement aux anthracyclines. Cependant, ces études ne permettent pas de conclure sur la sensibilité des outils d'imagerie à la détection précoce de cette cardiotoxicité. Un suivi de sujets en cours de traitement aux anthracyclines serait nécessaire, mais impliquerait des examens supplémentaires chez des patients extrêmement fatigués.

Le modèle animal est la solution technique au développement d'outils de diagnostic précoce ou de traitements alternatifs. Le miniporc est l'animal le plus adéquat pour étudier le traitement à la doxorubicine, mais n'a jamais été utilisé pour un diagnostic précoce de la cardiotoxicité.

L'objectif à long-terme est de développer une technique clinique sensible et non-invasive permettant la détection précoce et le suivi des changements apparaissant dans la distribution des propriétés mécaniques du tissu cardiaque en présence d'une insuffisance cardiaque induite par la doxorubicine, et par conséquent le guidage de l'approche thérapeutique des patients.

L'hypothèse de ce projet est que l'IRM multiparamétrique peut détecter les dommages précoces engendrés par la doxorubicine.

Plus spécifiquement, les objectifs poursuivis dans ce projet sont :

O1 – Développer un modèle d'insuffisance cardiaque induite par un traitement de doxorubicine chez un modèle animal approprié pour comparer les résultats d'imagerie à l'adolescent.

O2 - Déterminer la sensibilité de l'IRM multiparamétrique à détecter les changements structuraux précoces induits dans le tissu cardiaque par la doxorubicine par analyse des cartographies T1, T2, et des valeurs de déformation et contrainte.

Dans le premier chapitre, une revue de littérature est présentée afin de définir les différentes notions permettant de comprendre le contexte de recherche du sujet traité. Le chapitre 2 contient l'article décrivant à la fois les méthodes utilisées, les résultats obtenus ainsi que la discussion de ceux-ci conformément aux objectifs définis pour ce projet de maîtrise. Le chapitre 3 présente une discussion générale relatant les étapes complémentaires au bon déroulement du projet. Les perspectives à moyen et long termes de l'étude viennent clore ce mémoire de maîtrise.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Anatomie et structure

Le cœur est l'organe moteur du corps. Composé de fibres musculaires, il assure la circulation du sang en pompant celui-ci vers tous les autres organes du corps.

Il est composé de quatre cavités qui se contractent à intervalles de temps réguliers à chaque cycle cardiaque. Vers la base du cœur se trouvent les oreilles droite (OD) et gauche (OG) et vers l'apex les ventricules droit (VD) et gauche (VG). Les oreillettes ne communiquent pas entre-elles ni les ventricules entre eux. L'oreillette droite est reliée au ventricule droit par la valve tricuspide, composant ainsi ce qui est appelé le « cœur droit ». L'oreillette gauche est reliée au ventricule gauche par la valve mitrale, composant le « cœur gauche » (Figure 1.1).

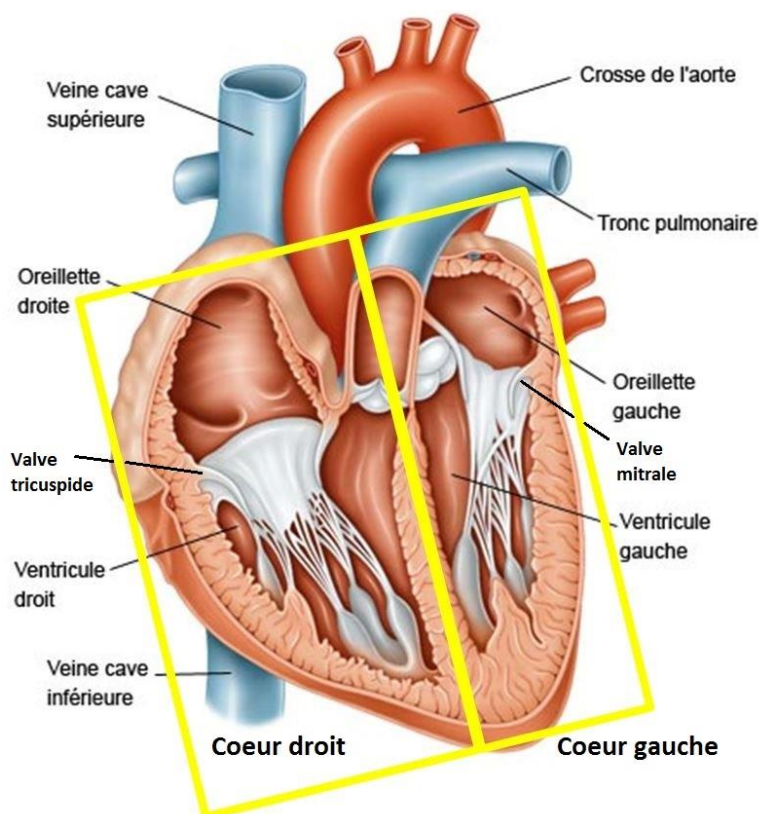


Figure 1.1 - Anatomie du myocarde – modifié de eureka.sante.vidal.fr

Les contractions permettent de pomper le sang à l'intérieur des cavités afin de le réoxygéner puis de le renvoyer vers tous les organes du corps. Pour cela, on distingue la petite circulation de la grande circulation (Figure 1.2). La petite circulation comprend l'arrivée du sang appauvri en oxygène dans l'oreille droite par la veine cave, le transfert vers le ventricule droit par la valve tricuspide, l'envoi du sang vers les capillaires pulmonaires, où ont lieu les échanges gazeux avec l'air compris dans les poumons, puis le retour du sang oxygéné vers le cœur gauche par la veine pulmonaire. La grande circulation comprend l'arrivée du sang dans l'oreillette gauche, son passage au ventricule gauche par la valve mitrale et la distribution du sang à tous les organes du corps en sortant par l'aorte.

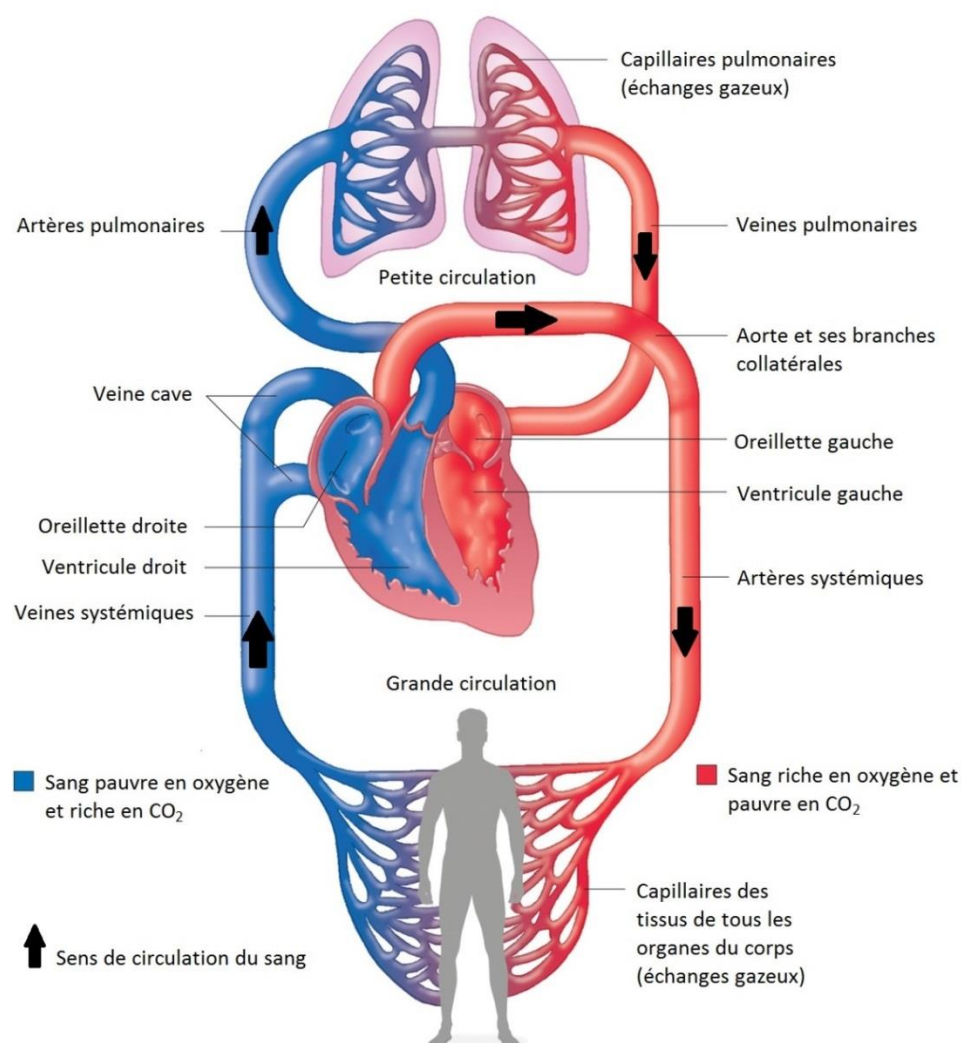


Figure 1.2 - Circulation sanguine – modifié de humananatomybody.info

Le cycle cardiaque se divise en deux grandes phases : la systole et la diastole. Lors de la systole, le cœur se contracte en commençant par les oreillettes qui envoient le sang vers les ventricules

qui se contractent également quelques fractions de secondes après tandis que les valves mitrale et tricuspide se referment. Lors de la diastole, le cœur se relâche, les valves aortique et pulmonaire se referment pour éviter le reflux du sang dans les ventricules tandis que le sang afflue dans les deux oreillettes.

Si l'un de ces éléments du fonctionnement normal de circulation sanguine est atteint alors on observe une dysfonction cardiaque pouvant être plus ou moins grave selon les cas.

1.1.1 Biologie et biochimie

Le cœur est un muscle composé de trois couches de différents types de tissus. La couche la plus interne est l'endocarde, c'est une mince membrane qui vient tapisser l'intérieur des cavités cardiaques. L'endocarde couvre le myocarde, celui-ci est un tissu musculaire strié et contractile qui constitue la majorité de la masse du cœur. Le myocarde est lui-même recouvert du péricarde, un tissu composé de deux feuillets qui peuvent glisser l'un par rapport à l'autre, facilitant les mouvements cardiaques. Entre le myocarde et chacune des couches pariétales se trouve le tissu conjonctif qui permet la protection, le soutien, l'isolement et l'union des organes du corps (Figure 1.3).

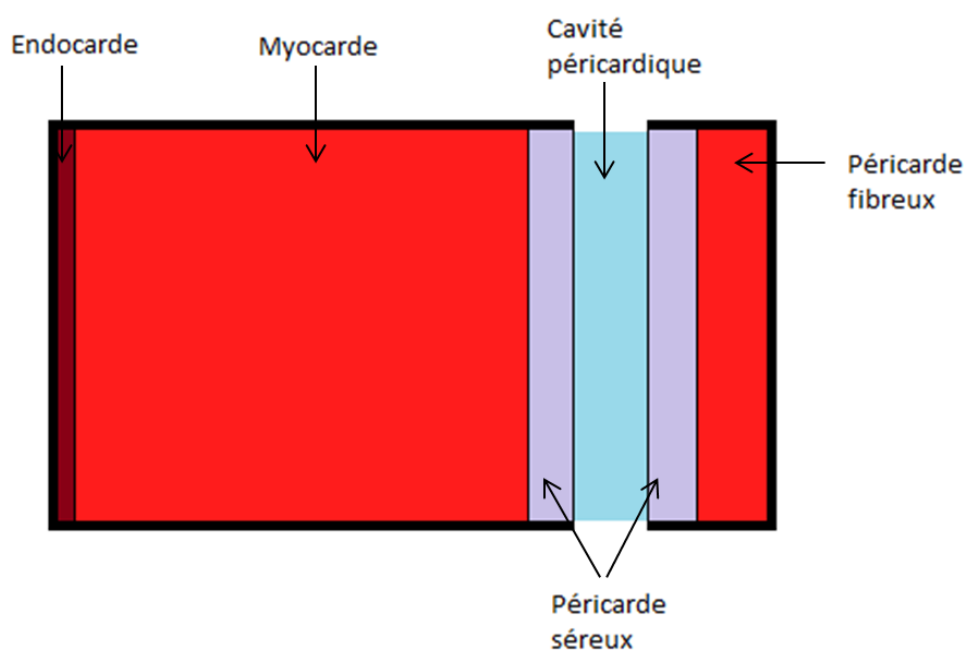


Figure 1.3 - Muscle cardiaque

A l'intérieur du muscle cardiaque et de son tissu conjonctif se trouvent les cardiomyocytes. Ces cellules véhiculent l'information nerveuse dans les différentes zones du cœur permettant la contraction du tissu dans chaque région tout au long du cycle cardiaque. Une déficience en cardiomyocytes démontre généralement la présence d'une pathologie cardiaque [1].

Les fibres sont incluses de manière espacée dans une substance extracellulaire appelée matrice extracellulaire. Ces fibres apportent force et soutien aux tissus. Les plus abondantes sont les fibres de collagène, en particulier le collagène de type I et III qui représente 90% du collagène total [2]. Ces fibres permettent au muscle cardiaque, grâce à leur agencement (Figure 1.4), leur flexibilité et leur résistance aux fortes tensions, de garder son organisation tridimensionnelle pendant le cycle cardiaque. Elles participent aussi aux propriétés viscoélastiques du cœur.

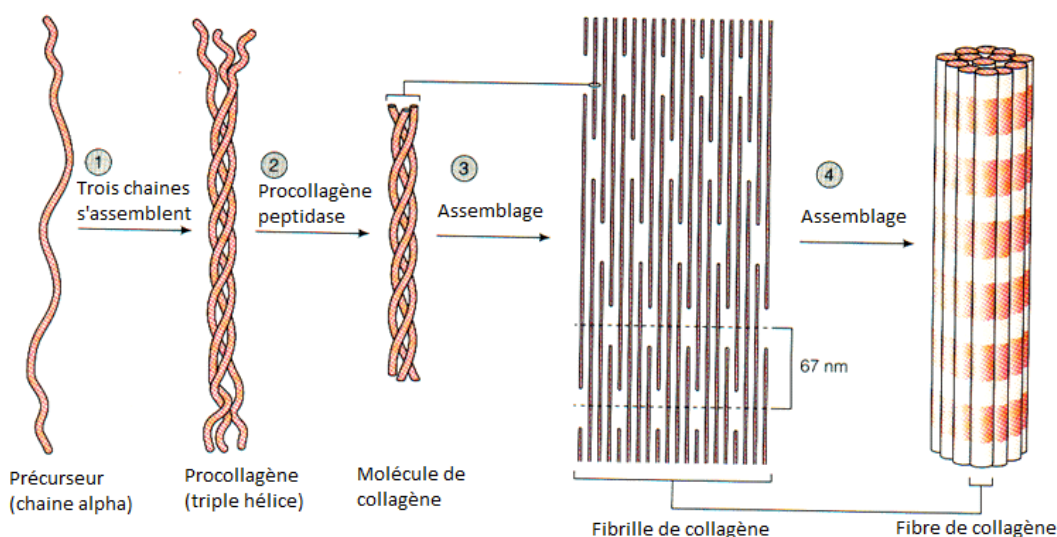


Figure 1.4 - Formation et agencement des fibres de collagènes –modifié de bionanotech2012.files.wordpress.com

D'autre part, les fibres d'élastine confèrent au myocarde son élasticité. Elles sont très étirables sans déchirures permettant ainsi la dilatation du cœur mais aussi la rétractation après étirement. Elles se présentent sous forme de fibres enroulées de façon aléatoire, changeant après chaque allongement (Figure 1.5).

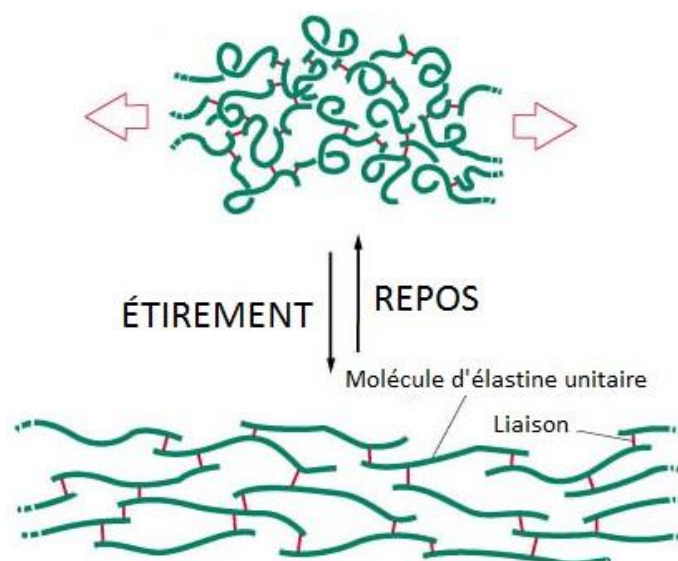


Figure 1.5 - Fibres d'élastine, design au repos (en haut) et lors de l'étirement (en bas) –
modifié de helpfromthedoctor.com

D'autres éléments très importants de la matrice extracellulaire sont les protéoglycanes. Ces molécules sont une combinaison entre une protéine et une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (Figure 1.6). Les protéoglycanes peuvent elles-mêmes se regrouper autour d'une chaîne d'acide hyaluronique formant des agrégats essentiels au tissu conjonctif (Figure 1.6). Ces agrégats ont pour rôle de piéger l'eau, d'organiser les fibres et de transporter certaines informations (diffusion de signalisation ou interaction avec des inhibiteurs).

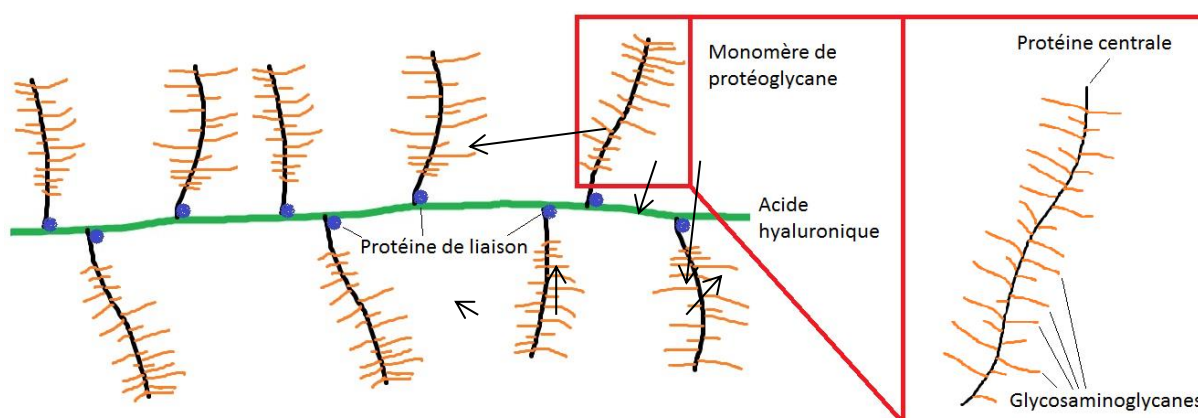


Figure 1.6 - Agrégat de protéoglycanes (à gauche) et molécule de protéoglycane unitaire (à droite)

La plupart des études du rôle de la matrice extracellulaire dans la mécanique du myocarde se basent sur l'étude des différents collagènes alors que les trois composantes (élastine, collagène et protéoglycanes) jouent toutes un rôle important dans la matrice extracellulaire [3].

1.2 Pathologies cardiaques : changements caractéristiques

Les maladies cardiovasculaires sont connues pour être l'une des principales causes de mortalité non accidentelles, en particuliers dans les pays développés. En 2007, les maladies cardiovasculaires représentaient 33.6% des décès aux États-Unis [4]. Elles sont essentiellement les conséquences de maladies coronariennes, d'insuffisances cardiaques, et d'arythmies cardiaques [5].

Ce projet s'intéresse plus spécifiquement à l'insuffisance cardiaque qui est une pathologie progressive dans laquelle le cœur n'est plus capable de maintenir un débit sanguin qui permet de couvrir les besoins énergétiques de l'organisme. C'est un syndrome grave avec un risque vital élevé. Selon la gravité des symptômes, l'âge et d'autres facteurs, il est estimé que le taux de mortalité annuel est compris entre 5% et 50% [6]. Au Canada, plus de 40 000 personnes meurent de ce type de pathologie chaque année [7].

1.2.1 Changements fonctionnels

L'insuffisance cardiaque peut atteindre le ventricule droit ou gauche. On parlera de dysfonction diastolique si la fonction de remplissage est réduite, et de dysfonction systolique si le volume d'éjection de l'un ou des deux ventricules est réduit. Il apparaît que la fonction cardiaque globale soit plus étroitement corrélée à la fonction diastolique qu'à la fonction systolique [8, 9]. Cependant, la dysfonction diastolique est plus complexe à démontrer [10]. Celle-ci peut être évaluée en particulier grâce au tracé de la relation pression-volume du ventricule gauche sur un ou plusieurs cycles cardiaques. Seulement, la mesure de pression se fait de façon invasive par cathéter. Afin d'éviter cette méthode, les techniques d'électrocardiogramme (ECG) et d'échocardiographie sont préférées et utilisées conjointement.

1.2.2 Changements biologiques et structurels

Étant donné que la matrice extracellulaire confère la force, le soutien et l'élasticité nécessaire à la bonne fonction du muscle cardiaque, une altération de sa composition biologique engendre un changement structurel du muscle qui engendre lui-même une modification de la fonction cardiaque. Ce n'est qu'après ces dernières modifications que surviennent les signes cliniques et que les méthodes actuelles sont capables de détecter la cardiomyopathie (voir paragraphe « 1.3 Pathologies cardiaques : détection / L'échocardiographie »).

Une dégradation excessive du réseau de collagène et d'élastine par une forte activité de protéases est constatée lors du développement d'une cardiomyopathie dilatée [2]. Étant donné que le réseau fibreux de maintien se démantèle, les cellules cardiaques glissent les unes par rapport aux autres impliquant la dilatation du ventricule.

Le contenu en élastine procure l'élasticité au tissu cardiaque, il est aussi bénéfique au processus de croissance de nouveaux vaisseaux et joue un rôle dans le remodelage des cellules [11]. Si ce contenu vient à diminuer, le cœur perd une protection précieuse, on peut penser que le tissu va se raidir et aura de plus grandes difficultés à se renouveler. Cependant, aucune étude ne présente de résultats isolant les mécanismes propres à l'élastine [3].

Dans les tissus cartilagineux, les protéoglycanes servent à contrôler les flux entrant et sortant de l'eau pendant un chargement mécanique. On peut supposer qu'il en va de même dans le tissu cardiaque mais le rôle mécanique des protéoglycanes dans ce tissu reste à prouver [3]. Peu d'études s'intéressent aux protéoglycanes car elles sont difficiles à fixer, donc à observer et quantifier, avec les méthodes histochimiques traditionnellement utilisées [3]. Mais certains leur attribuent un rôle important dans le volume des parois myocardiques pendant le cycle de battement, ce volume étant lui-même un indicateur de la santé du cœur.

Les changements biologiques sont les premiers à apparaître dans le processus de dégradation cardiaque, mais ceux-ci sont difficilement visibles précocement *in vivo*. Les changements structurels en découlant continuent d'être l'objet de nombreuses recherches car le suivi des changements dans les propriétés mécaniques d'un tissu nous informe sur la viabilité de celui-ci. Dans le tissu cardiaque, les tests mécaniques en traction effectués, *in vitro* et *ex vivo*, ne donnent pas des mesures fiables de ces propriétés qui changent dans le tissu passif en fonction du protocole expérimental [12]. *In vivo*, la caractérisation des propriétés cardiaques, par imagerie, est très délicate du fait que celles-ci changent périodiquement au cours du cycle

cardiaque. La complexité de la distribution des contraintes et déformations dans le tissu cardiaque pousse les auteurs à estimer les résultats sur le cœur complet à l'aide de méthodes informatiques [13-16]. Notre équipe a par exemple développé un programme Matlab pour l'analyse des contraintes et déformations du tissu cardiaque au cours du cycle de battements cardiaques [17].

1.3 Pathologies cardiaques : détection

1.3.1 L'électrocardiogramme (ECG)

L'électrocardiogramme est un moyen d'obtenir de l'information simplement, rapidement et sans douleur sur l'activité électrique du cœur. L'ECG est le résultat d'un test d'électrocardiographie réalisé à l'aide d'électrodes posées sur certains points du corps du patient (Figure 1.7). Il est représenté sous forme de plusieurs tracés à l'interprétation assez complexe que le médecin apprend avec la pratique. Ce tracé est composé de divers événements répétitifs appelés « ondes » (Figure 1.8). L'ECG normal comporte l'onde P suivie du segment PQ, du complexe QRS puis du segment ST, d'une onde T, et d'une onde U plus difficilement visible [18]. Chacune de ces ondes a une durée, une amplitude et un axe qui sont mesurés afin de vérifier leur conformité à la norme. L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, c'est-à-dire au moment où les oreillettes se contractent. Le complexe QRS représente la dépolarisation des ventricules droit et gauche, c'est-à-dire leur contraction. L'onde T indique la repolarisation des ventricules, leur relaxation. L'onde correspondant à la repolarisation des oreillettes est quant à elle masquée par le complexe QRS. Enfin l'onde U est parfois visible mais son origine est discutée [18].

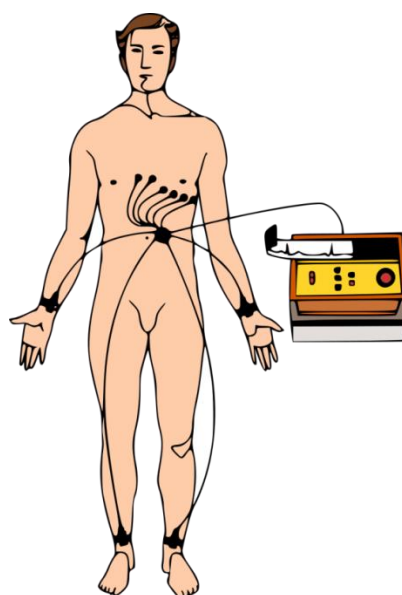


Figure 1.7 - Positionnement des électrodes pour l'enregistrement d'un électrocardiogramme –
tiré de boundless.com

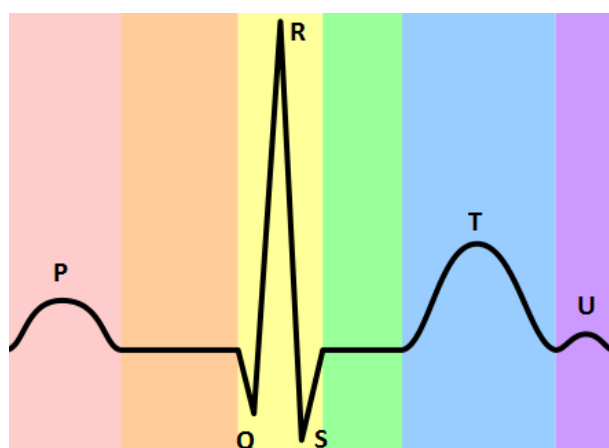


Figure 1.8 - Tracé ECG –modifié de wikimedia

Un ECG anormal, où une ou plusieurs ondes ou segments sont hors normes, peut refléter une anomalie fonctionnelle du cœur comme, par exemple, une arythmie ou un ventricule gauche trop épais qui remplit mal sa fonction de pompe.

1.3.2 L'échocardiographie

Pour préciser le diagnostic, l'échocardiographie est utilisée. C'est une méthode non invasive qui utilise la physique des ultrasons. Elle permet d'explorer la morphologie et la dynamique du

muscle cardiaque ainsi que la circulation du sang à l'intérieur des cavités et de mesurer les flux sanguins [19-24].

Le principe de l'échographie est d'envoyer une onde ultrasonore (fréquence supérieure à 20kHz) à travers le corps grâce à un transducteur qui convertit le signal électrique en un signal acoustique et vice versa. L'onde se propage dans les tissus et les fluides.

Le protocole standard de détection des cardiomyopathies comprend des acquisitions d'images en mode M, en mode deux dimensions (2D), et en mode Doppler. Une image de mode M ne représente pas l'anatomie du cœur mais donne de l'information sur le mouvement des structures qui le composent. Le mode M utilise une haute fréquence d'échantillonnage qui permet une haute résolution d'image afin de calculer les dimensions des structures avec précision (Figure 1.9).

Les images acquises par échographie 2D représentent une coupe anatomique du corps en temps réel [25] (Figure 1.9). Appliquée au cœur, cette technique permet d'obtenir des informations structurelles et fonctionnelles sur le muscle cardiaque.

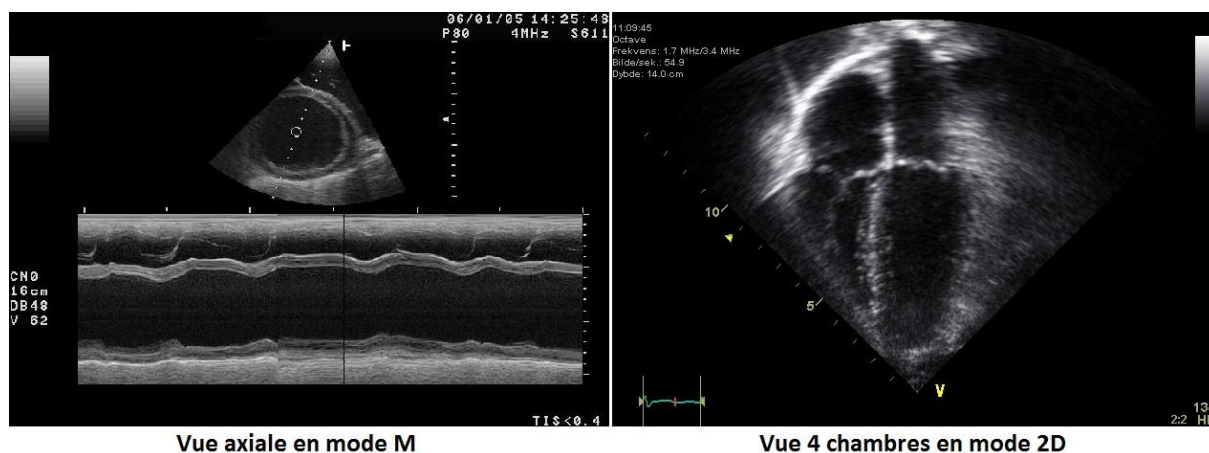


Figure 1.9 - Images échocardiographiques : mode M (à gauche); mode à deux dimensions (à droite) - tiré de wikimedia

Le mode Doppler utilise la physique de l'effet Doppler. En effet, les ondes sonores réfléchies par une structure en mouvement peuvent être compressées ou étendues en fonction de la direction du déplacement (Figure 1.10). Par conséquent, quand une onde est envoyée dans la direction du flux sanguin, le mouvement des cellules sanguines produit un décalage de Doppler

en fréquence. Si la différence est positive, alors le flux s'écoule vers la sonde, à l'inverse si la différence est négative, le flux s'éloigne du transducteur. De plus l'amplitude du décalage nous informe sur la vitesse du flux sanguin.

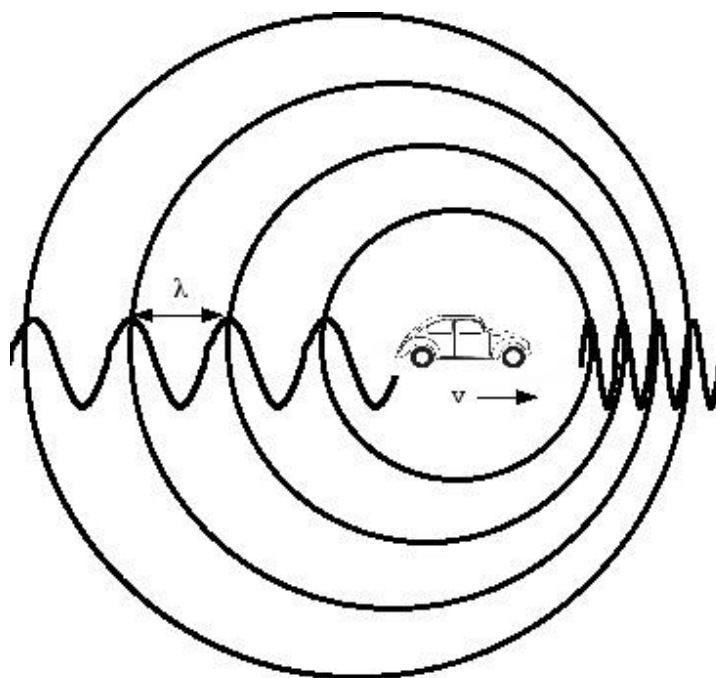


Figure 1.10 - Perception de l'onde sonore en fonction du déplacement d'un objet. λ la longueur d'onde; v la vitesse de déplacement –modifié de chimix.com

Ce sont principalement des vitesses de flux relativement lentes qu'il est possible de mesurer par imagerie Doppler comme, par exemple, le flux dans la veine pulmonaire, le flux entrant dans le ventricule gauche par la valve mitrale (Figure 1.11) ou le flux sortant du ventricule gauche par la valve aortique s'il n'est pas trop rapide.

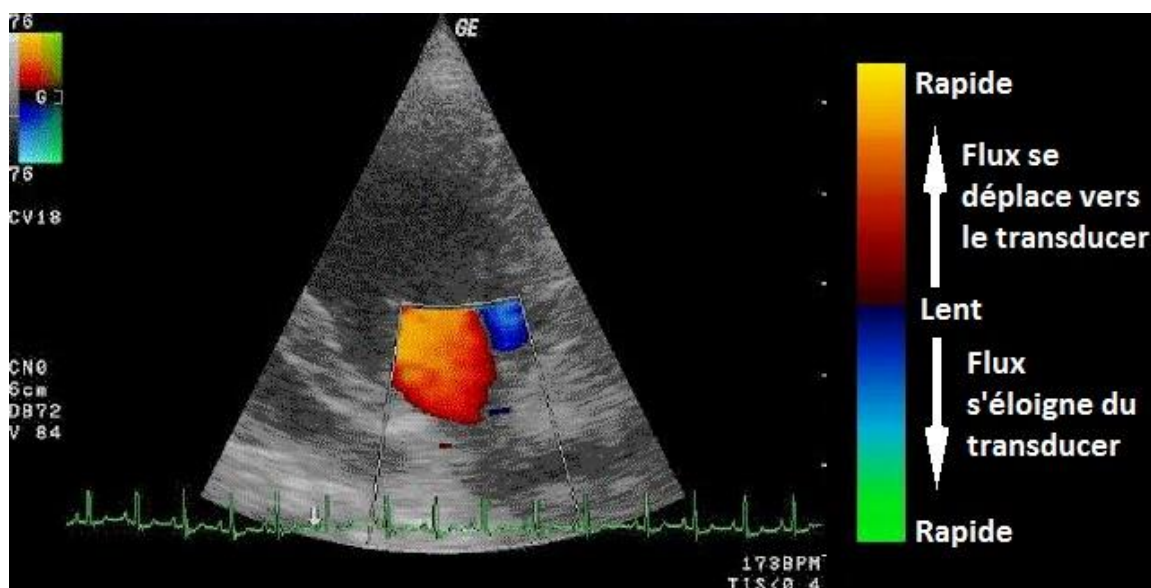


Figure 1.11 - Image d'échographie Doppler de la valve mitrale (à gauche); échelle de couleur (à droite) représentant la vitesse et la direction du flux superposé à l'image échographique –
modifié de wikipedia et sites.google.com/

Lors d'un examen échocardiographique, différents paramètres sont mesurés ou calculés afin de déterminer la santé du myocarde. Les techniciens et médecins regardent en particulier des paramètres hémodynamiques comme la fraction d'éjection du ventricule gauche, qui est le pourcentage de sang éjecté du VG pendant un battement, indicateur important de la santé du myocarde; la fraction de raccourcissement du VG, qui représente le raccourcissement du diamètre ventriculaire en diastole par rapport au diamètre systolique; les vitesses myocardiques à l'anneau mitral; ou des paramètres de mesures tels que l'épaisseur diastolique de la paroi postérieure du VG et celle de la paroi du septum. Ces éléments sont une partie des marqueurs de changements fonctionnels pouvant survenir à cause d'une cardiomyopathie. Ces mesures ne sont réalisables qu'une fois la maladie bien en place [24].

Suite au traitement, les patients sont suivis pendant plusieurs années afin de contrôler l'apparition d'une pathologie cardiaque. Chez 50% des patients, la fraction d'éjection devient anormale 6 mois après la chimiothérapie [19]. Or, des études portant sur l'étude des changements précoces du myocarde suite à une chimiothérapie montrent que les altérations de la déformation myocardique surviennent avant un changement significatif dans la fraction d'éjection [24]. Ceci suggère que les changements de structure sont précoces, d'où l'importance de trouver la bonne méthode pour les détecter.

1.4 Anthracyclines

1.4.1 Utilisation

Les anthracyclines sont une famille de médicaments de type antibiotiques. La première molécule de cette famille, la daunorubicine, a été isolée en 1963 [26]. Son action anti-leucémique a rapidement été constatée. Puis son analogue naturel, la doxorubicine, a été isolé. Il a été remarqué que l'action anticancéreuse de cette molécule s'étendait même aux tumeurs solides. Aujourd'hui, un très grand nombre de molécules ont été isolées ou synthétisées, mais très peu sont arrivées jusqu'à l'utilisation en clinique. C'est toujours la doxorubicine qui domine le marché occidental et japonais [27] même si la daunorubicine [28], l'épirubicine [29] et l'idarubicine [30] sont parfois utilisées.

Les anthracyclines sont des médicaments utilisés lors des chimiothérapies prescrites pour guérir différents types de cancers, en particulier les cancers du sang comme les leucémies mais aussi dans les tumeurs solides comme pour le cancer des os, du sein ou des gonades. Leur mécanisme consiste à interagir directement avec l'ADN des cellules cancéreuses en inhibant sa synthèse [27]. Après plusieurs étapes transformant l'enzyme topoisomérase II en un poison pour la cellule, celle-ci meurt. Les anthracyclines font donc partie de la famille des médicaments cytotoxiques (qui empoisonnent les cellules).

La doxorubicine se présente sous forme de poudre lyophilisée qu'il faut mélanger à de l'eau stérile jusqu'à obtenir une concentration standard de 2mg/ml. Elle s'administre ensuite de manière intraveineuse, soit en bolus, c'est-à-dire que la dose totale est injectée assez rapidement, soit de manière prolongée, c'est-à-dire sur plusieurs heures voire plusieurs jours. Cliniquement c'est le bolus qui est la méthode la plus utilisée actuellement en particulier pour les faibles doses. L'injection prolongée est testée en recherche depuis plusieurs années, elle montre l'avantage de réduire significativement le risque d'insuffisance cardiaque (voir paragraphe suivant « Effets secondaires »). La dose varie selon le patient et se trouve en général entre 30 et 70mg/m² [27] administrée toutes les trois semaines jusqu'à une dose totale cumulative déterminée par le médecin. Communément, la dose maximale tolérée à chaque trois semaines est de 120mg/m² [27].

1.4.2 Effets secondaires chez l'humain

L'effet le plus fréquent est l'alopecie, c'est-à-dire la perte de tous les poils et cheveux. Bien qu'il soit sans conséquence sur la santé du patient, cet effet est le plus communément craint par les patients et l'un des facteurs psychologiques les plus ravageurs de la chimiothérapie.

D'autres symptômes sont très courants et se guérissent plus ou moins facilement: les vomissements, les nausées, les diarrhées, la perte d'appétit.

Les anthracyclines provoquent aussi une chute du nombre de globules blancs, globules rouges et plaquettes qui se trouvent dans la moelle osseuse. Ce phénomène, appelé la myélosuppression, fragilise le système immunitaire. Le risque d'infection grave est donc augmenté, les patients sont à surveiller de près.

La séquelle à laquelle s'intéresse ce projet est l'effet cardiotoxique des anthracyclines, aujourd'hui bien connu des médecins et chercheurs. Bien que l'incidence des dysfonctions cardiaques soit relativement basse (10.6%) comparée à celles des autres effets de la chimiothérapie, son implication dans les pronostics de survie des patients est inquiétante [31, 32]. L'effet cardiotoxique se manifeste en particulier chez les patients qui reçoivent un haut dosage ou qui doivent subir une radiothérapie du thorax [32]. Il est aussi fonction de l'appartenance du patient à l'ethnie africaine-américaine, de l'âge très jeune ou très avancé, du diabète, de l'hypertension et d'un poids très bas ou très élevé au moment du traitement [32]. Un patient qui possède l'un des facteurs précédents devra être suivi de près et des mesures préventives seront prises. Afin de réduire l'effet cardiotoxique, les médecins-chercheurs ont analysé plusieurs pistes ces dernières années. Une méta-analyse publiée récemment par A. Conway, A.L. McCarthy, P. Lawrence et R.A. Clark, regroupe les quatre stratégies principalement considérées comme potentiellement avantageuses [33]. D'abord, il y aurait la possibilité de donner un autre médicament appelé dexrazoxane de manière concomitante à l'anthracycline. Cependant la dexrazoxane augmente légèrement l'effet de myélosuppression [34]. Deuxièmement, il faudrait simplement éviter l'administration d'anthracycline dès que possible. Ensuite, il serait envisageable de réaliser des injections dites continues (<6h) à la place de l'injection en bolus. Enfin, l'utilisation d'un dérivé de la doxorubicine comme l'épirubicine ou la doxorubicine liposomale peut être envisagée [33]. Toutes ces techniques ont un potentiel limité à réduire le risque de lésions cardiaques. L'étude citée montre le manque de marqueurs

spécifiques qui guideraient, avec une précision suffisante, la décision du médecin quant à la détection et la gestion de la cardiotoxicité due à la doxorubicine et aux autres anthracyclines.

1.5 Etudes antérieures de la cardiotoxicité des anthracyclines et justification du protocole animal

1.5.1 Effet de la doxorubicine sur le petit animal et le chien

La structure et la fonction cardiaque sont similaires chez tous les mammifères [35], ce qui a amené les scientifiques à utiliser différents types de mammifères pour les recherches touchant le système cardiovasculaire. En ce qui concerne l'étude de la cardiotoxicité de la doxorubicine, c'est le rat qui est utilisé dans les premières études dès les années 70. Un exemple est l'étude de Mettler *et al.* (1977) qui évalue la faisabilité d'utiliser le rat comme modèle pour l'induction d'une cardiotoxicité chronique [26]. Depuis ces premières études animales, des types variés de protocoles sont proposés pour comprendre les pathomécanismes de la doxorubicine et tenter de trouver un bon cardioprotecteur. Par exemple, dans l'étude de l'oxydation de l'ADN mitochondriale, un premier projet reporte l'injection de 2 à 8 doses (2mg/kg) de façon hebdomadaire par voie sous-cutanée et permet d'analyser le caractère cardiosélectif et cumulatif de cette oxydation [36]. Une autre étude s'appuie sur celle-ci en reprenant le protocole hebdomadaire sur 6 semaines pour investiguer la cause de la persistance des adduits d'ADN mitochondrial 1 à 5 semaines après la dernière injection [37]. On peut noter que le gain de masse chez les rats du groupe Doxo était en retard par rapport au groupe contrôle. De même que dans une étude sur l'accumulation d'ADN mitochondrial dans laquelle seuls les animaux du groupe recevant 7 doses (1mg/kg) de doxorubicine par intraveineuse pendant 7 semaines, ont développé une cardiomyopathie et ont également souffert de trouble de la fréquence respiratoire en plus de leur arrêt de prise de poids [38]. Pour l'étude de la lycopène comme cardioprotecteur, une première étude propose une dose unique sous-cutanée de 10mg/kg pour l'analyse biochimique du tissu cardiaque 3 jours après l'injection [39]. Puis un projet fait suite avec un protocole incluant 4 injections de 4mg/kg, une injection par semaine, résultant à un taux de 50% de morts prématurées, ainsi qu'une perte de poids, une réduction de l'activité physique et un faible agrandissement du ventricule gauche des animaux dans les groupes Doxo [40].

D'autres études recherchant un cardioprotecteur ont utilisé des chiens Beagle, comme Herman et Ferrans en 1981 [41], après des essais inconsistants sur des lapins. Une dose intraveineuse hebdomadaire de 1mg/kg pendant 15 semaines a conduit à des lésions cardiaques montrant une vacuolisation cytoplasmique et une perte de protéines myofibrillaires. Les animaux du groupe Doxo ont subi la perte de leurs poils (alopécie), une perte d'appétit dans les 24 heures suivant les injections ainsi qu'une perte de poids sur la durée totale du projet.

1.5.2 Modèle porcin : avantages et réaction face à la doxorubicine

Le miniporc semble être le meilleur modèle pour l'évaluation de la fonction cardiaque, en raison des similitudes qu'il existe entre lui et l'humain quant à leur anatomie cardiaque, leur métabolisme, leur pathophysiologie [42] et leur biochimie [43]. Plusieurs études concluent donc que le modèle porcin est mieux adapté à l'étude du système cardiovasculaire humain et des pathologies qui le touchent [44-48].

Concernant l'effet de la doxorubicine sur le miniporc, contrairement à d'autres animaux étudiés, et en dehors de la dépression de la moelle osseuse, il ne semble pas présenter de dommages dans les organes non cardiaques, similairement à l'humain [49]. Plusieurs types de protocoles ont été utilisés sur ce modèle. Les études traitant de l'élimination hépatique de la doxorubicine, comme dans celle d'August *et al.* (1995) [50], ou celle de Dubbelboer *et al.* (2014) [51], ont tendance à choisir un protocole avec injection unique. August *et al.* ont séparé leurs 34 animaux en 5 groupes recevant une dose de 0.5, 1, 3, 5 ou 9mg/kg de doxorubicine sur 90min. 28 porcs ont survécu au moins 90min après l'arrêt de l'infusion. 4 porcs ayant reçu une dose de 5mg/kg ou plus sont décédés prématurément (2 sur 2 dans le groupe 9mg/kg), et des signes d'œdème pulmonaire et de congestion hépatique étaient visibles à l'analyse post-mortem de ces animaux. Dubbelboer *et al.* ont investigué l'effet de la cyclosporine et du Lipiodol sur l'élimination hépatique de la doxorubicine. 12 porcs ont reçu 2 fois 1.7mg/kg à 200min d'écart et ont été séparés en 4 groupes. 3 porcs ont reçu une injection de saline, 3 ont reçu de la cyclosporine, 3 ont reçu du Lipiodol et 3 ont reçu de la cyclosporine et du Lipiodol. Les auteurs ont conclu que l'injection consécutive de deux doses de doxorubicine n'avait pas de conséquence sur la pharmacocinétique de la doxorubicine et qu'alors que le Lipiodol n'a aucun effet sur l'évacuation de la doxorubicine, la cyclosporine pourrait aider à réduire l'excrétion biliaire de la doxorubicine.

L'injection en dose unique de doxorubicine ne représente pas le protocole clinique et ne permet pas le développement de lésions cardiaques chroniques observées cliniquement. D'autres équipes ont utilisé le porc et le porcelet pour évaluer la fonction cardiaque. Cassidy *et al.* ont injecté 5 doses de 1.5mg/kg, une dose chaque 4 à 7 jours et ont trouvé des différences significatives entre la fonction diastolique du groupe sain et de celle du groupe recevant la doxorubicine [52]. Ils ont également remarqué un ralentissement de la croissance des porcs du groupe expérimental, certainement dû au développement de la maladie chronique. Christiansen *et al.* ont choisi d'injecter des doses de 25mg non-dépendantes du poids des animaux, chaque semaine pour un total de 3 à 5 doses [53]. Leurs résultats échocardiographiques montrent une augmentation du volume interne du ventricule gauche et une diminution de l'épaisseur de ses parois, de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement. A l'inverse aucun changement dans le volume et la fonction du ventricule droit n'a été observé. Herman et Ferrans ont injecté 5 à 6 doses de 1.6 ou 2.4mg/kg directement dans la veine cave chez des miniporcs pour investiguer l'effet de la vitamine E et de l'ICRF-187 comme cardioprotecteur. Le premier effet observé de la doxorubicine était l'alopécie et, en dehors de la dépression de la moelle épinière, aucun dommage n'a été observé sur les organes non cardiaques.

1.6 Imagerie par résonance magnétique (IRM) Fonctionnement général

L'IRM est une méthode d'imagerie non invasive pour observer la structure interne du corps humain selon les trois dimensions. Inventée dans les années 70, principalement par R.V. Damadian considéré comme le père de l'IRM. Elle se base sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire [54].

1.6.1.1 Principes physiques

Le corps est composé d'atomes et ceux-ci détiennent chacun un nombre de charges positives et un nombre de charges négatives. Si l'un des deux est impair, alors l'atome possède un moment magnétique, c'est-à-dire que le noyau tourne sur lui-même dans une certaine direction. Ce moment est appelé *spin* (de l'anglais « spinning », rotation), et est représenté par un vecteur correspondant à l'axe de rotation. Cet axe est lui-même en mouvement, il oscille en formant un

cône. Ce mouvement est appelé mouvement de précession et peut être décrit par deux composantes, l'une longitudinale et l'autre transversale. Pour l'Imagerie par Résonance Magnétique, c'est la précession de l'atome d'hydrogène, ou proton, qui est considérée comme responsable de la formation d'images. Présent principalement dans l'eau et la graisse, l'atome d'hydrogène est abondant dans le corps et envoie de forts signaux de résonance. De ce fait, l'IRM permet principalement la visualisation des tissus mous et des fluides corporels.

Au repos, chaque *spin* a une direction aléatoire et la résultante magnétique est alors nulle. Sous l'action d'un champ magnétique B_0 important, les vecteurs s'alignent dans la direction de celui-ci, en s'orientant soit dans le même sens (parallèlement à l'axe B_0), soit dans le sens inverse (antiparallèlement à l'axe B_0) (Figure 1.12.a) [55]. D'après la statistique de Boltzmann [56], la proportion des *spins* orientés dans le sens du champ magnétique appliqué est supérieure à celle des *spins* orientés dans le sens inverse. De plus, l'écart entre ces proportions est proportionnel à l'amplitude du champ B_0 . Pour former chaque pixel de l'image, une multitude de protons sont concernés, la résultante magnétique sur l'axe longitudinal est donc une aimantation dans la même direction et le même sens que B_0 (Figure 1.12.b). D'autre part, la composante transversale peut être ignorée puisque les mouvements de précession des *spins* ne sont pas en phase [57, 58].

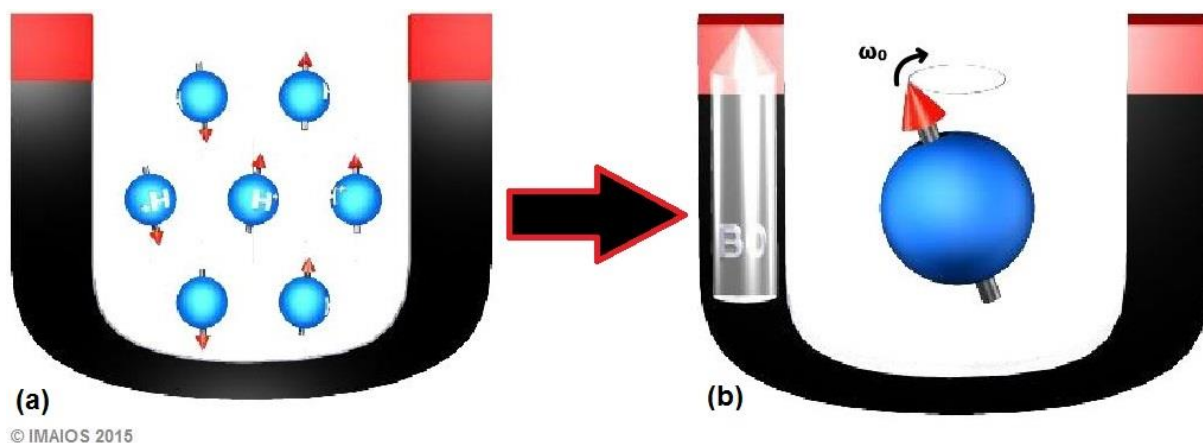


Figure 1.12 - (a) Les spins des protons s'alignent au champ B_0 ; (b) aimantation résultante dans la direction et le sens de B_0 –modifié de imaios.com

La résonance est permise par le fait que deux systèmes ayant la même fréquence peuvent effectuer un transfert d'énergie. L'onde de radiofréquence (RF) va interagir avec les atomes seulement si sa fréquence est celle de précession des moments magnétiques. L'envoi d'une onde RF va apporter de l'énergie au système et ainsi faire basculer les *spins* selon un certain

angle, dépendamment de l'intensité et de la durée de l'onde: c'est la phase d'excitation. En interrompant l'émission de l'onde, le système va restituer l'énergie emmagasinée en revenant à l'état initial: c'est la phase de relaxation [57, 58].

1.6.1.2 Excitation-relaxation

A la première impulsion RF, la forme de l'onde permet une bascule de l'aimantation tout en gardant le mouvement de précession. On choisit souvent une bascule à 90° pendant laquelle l'aimantation longitudinale va diminuer jusqu'à s'annuler et l'aimantation transversale va augmenter, permettant ainsi de maximiser le signal envoyé par le groupe de *spins*.

Vient alors la phase de relaxation qui correspond au retour à l'équilibre de l'aimantation dans l'axe du champ B_0 . L'énergie restituée correspond à une onde RF, c'est elle qui constitue le signal enregistré en résonance magnétique nucléaire pour la reconstitution des images. Deux phénomènes se produisent: la relaxation longitudinale qui correspond à la repousse de la composante longitudinale des moments magnétiques selon l'axe de B_0 , et la relaxation transversale qui correspond à la décroissance de la composante transversale. La relaxation longitudinale, suivant une courbe exponentielle, est caractérisée par le temps T_1 , constante qui s'obtient à 63% de la valeur finale de l'aimantation longitudinale (Figure 1.13) [57]. Pour un champ de 1,5 Tesla, T_1 se trouve entre 200 et 3000ms. Ce temps dépend de la mobilité des molécules dont les protons font partie, il est donc plus court pour des protons contenus dans de grosses molécules.

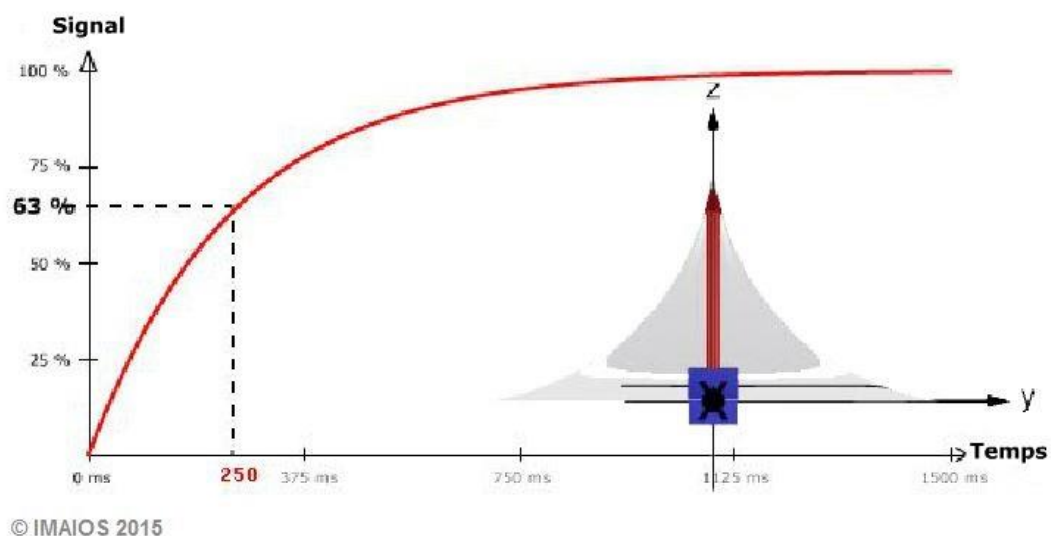


Figure 1.13 - Relaxation longitudinale – tiré de imaios.com

La relaxation transversale, suivant une courbe exponentielle décroissante, est caractérisée par les temps T_2 et T_2^* . T_2^* s'obtient au passage de la courbe à 37% de la valeur initiale de l'aimantation transversale, tandis que T_2 s'obtient après le rétablissement de la cohérence de phase, causée par les hétérogénéités de champ, grâce à l'application d'une deuxième onde RF (Figure 1.14) [57].

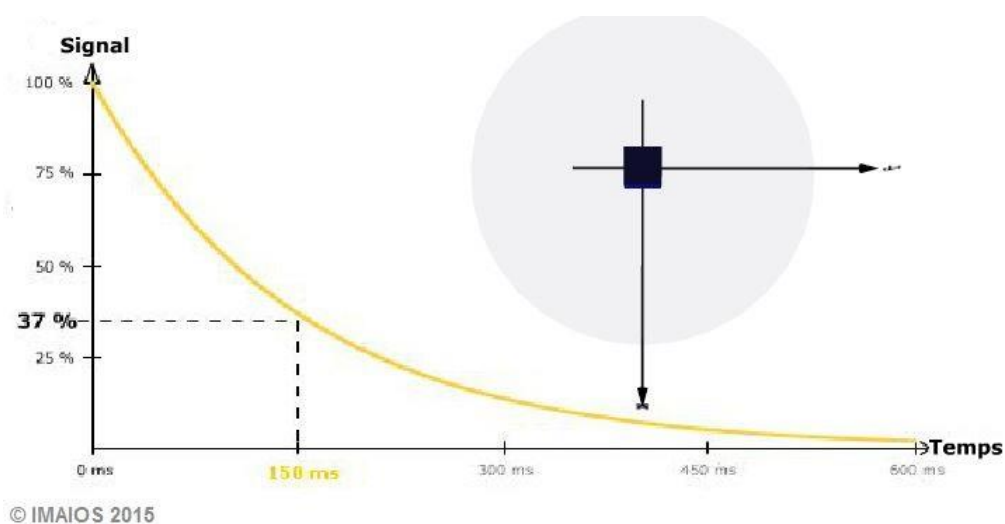
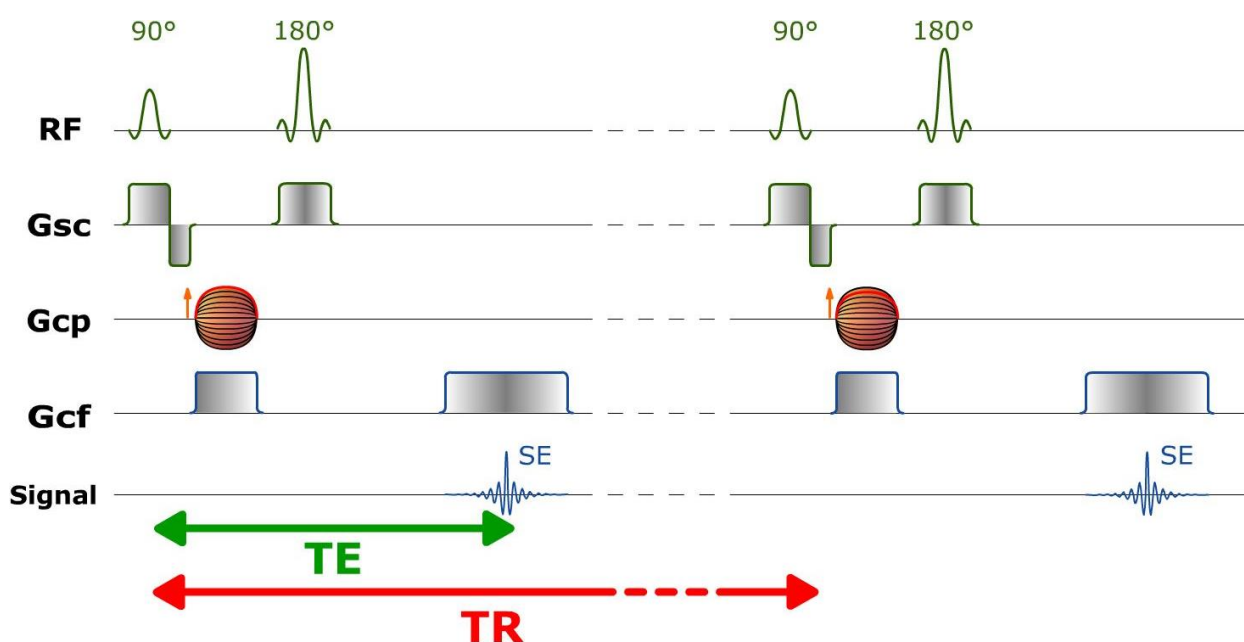


Figure 1.14 - Relaxation transversale– tiré de imaios.com

1.6.1.3 Séquences IRM

Grâce au transfert d'énergie des protons d'hydrogène restitué lors du retour à l'équilibre, il est possible d'obtenir une valeur d'intensité de signal IRM pour chaque pixel de l'image [57, 58]. La position des pixels est générée grâce à l'apposition de gradients de champ magnétique.

Dans la séquence de base pour obtenir des images pondérées en T_2 (appelée *écho de spin*), on envoie une seconde impulsion après celle de 90° , cette fois-ci de 180° , qui permet de rétablir la cohérence entre les phases. Deux paramètres sont à gérer dans la préparation de cette séquence : le temps d'écho, TE (temps entre l'impulsion de 90° et la réception de l'écho. A noter : l'impulsion de 180° est émise à TE/2) et le temps de répétition de la séquence, TR (entre deux impulsions de 90°) [59] (Figure 1.15).

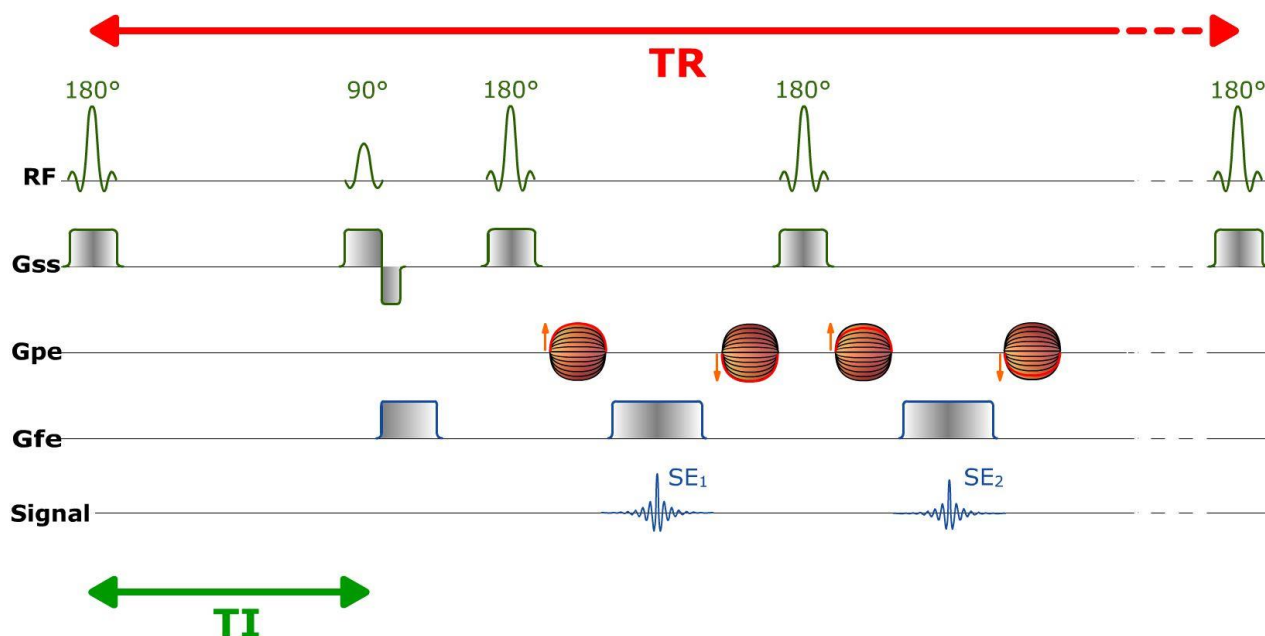


© IMAIOS 2016

Figure 1.15 - Séquence écho de spin – tiré de imaios.com – RF : onde radiofréquence, Gsc : gradient de coupe, Gcp : gradient de phase, Gcf : gradient de fréquence.

Pour obtenir des images pondérées en T_1 , c'est la technique d'inversion-récupération qui est utilisée car elle s'appuie sur la relaxation longitudinale qui est associée à T_1 . La séquence commence par une impulsion à 180° qui fait s'inverser l'aimantation longitudinale dans la direction opposée au champ principal B_0 . Avant la fin de la relaxation de l'aimantation, on

début une séquence d'écho de spin avec une impulsion à 90° pour obtenir une aimantation transversale. On appelle temps d'inversion, TI, le temps écoulé entre l'impulsion d'inversion de 180° et l'onde RF d'excitation de 90° (Figure 1.16).



© IMAIOS 2016

Figure 1.16 - Séquence d'inversion-récupération – tiré de imaios.com – RF : onde radiofréquence, Gss : gradient de coupe, Gpe : gradient de phase, Gfe : gradient de fréquence.

Les différentes séquences IRM existantes produisent différents types d'images avec différentes informations. Le choix de la séquence dépend de l'application souhaitée. Chaque séquence a ses avantages et ses inconvénients et permet une représentation de certains tissus spécifiques. Il existe également des séquences qui requièrent l'utilisation d'un agent de contraste afin d'améliorer l'analyse de certaines textures, comme le sein ou le foie [60-62], ou de décrire le passage d'un des fluides du corps, comme celui du sang ou du liquide cébrospinal [63, 64].

1.6.1.4 Génération d'images

Le signal IRM est enregistré après chaque séquence dans une matrice appelée espace K (ou plan de Fourier). Au centre de l'image du plan de Fourier se trouve les basses fréquences (Figure 1.17.a), celles-ci représentent les formes présentes sur l'image résultante et le contraste entre

elles (Figure 1.17.b). Sur les bords de l'image de l'espace K se trouvent les hautes fréquences (Figure 1.17.c), celles-ci codent pour les détails de l'image spatiale, les contours et donc la résolution de l'image finale (Figure 1.17.d). La résolution sera meilleure si les données de fréquence spatiale sont élevées. Une transformée de Fourier 2D inverse est utilisée afin de convertir ces données brutes du domaine fréquentiel au domaine spatial.

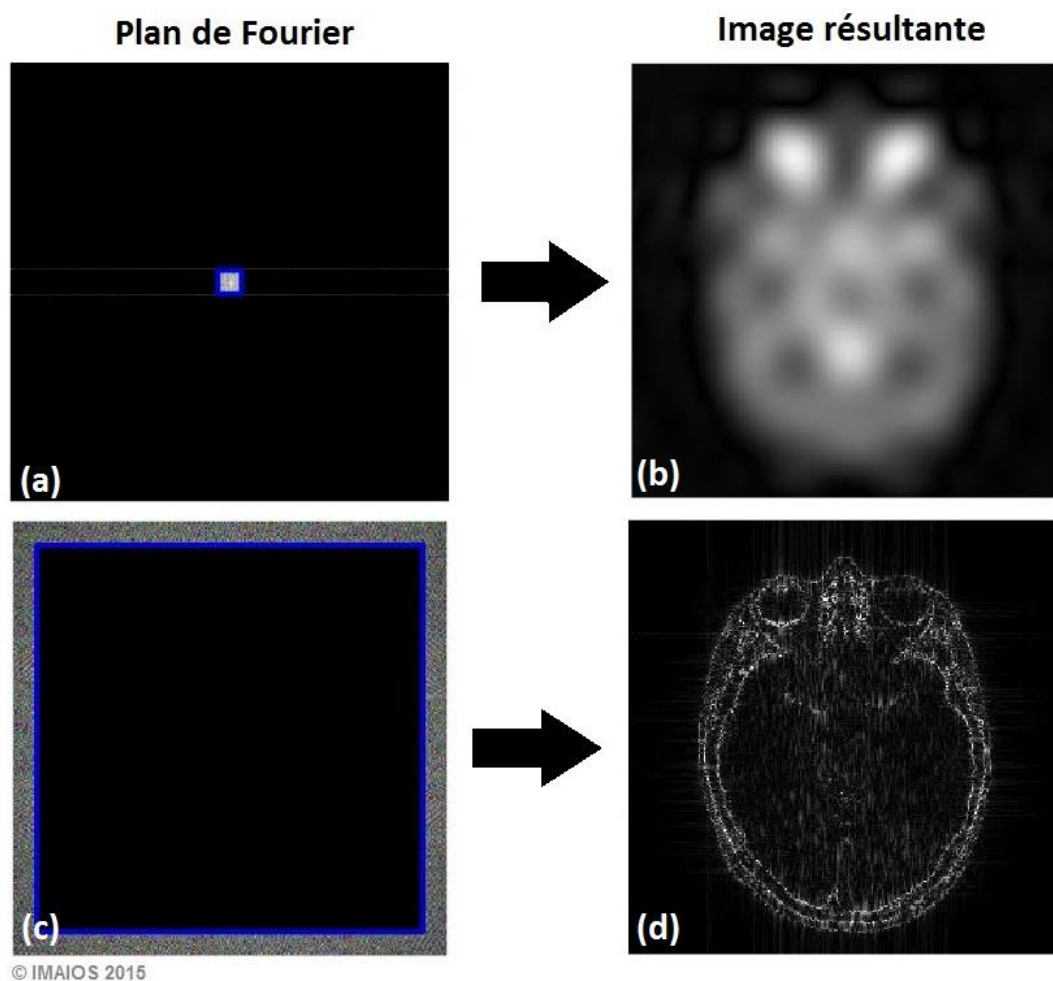


Figure 1.17 - (a) Partie centrale de l'image dans l'espace K; (b) Image résultante lorsque seules les basses fréquences de l'espace K sont gardées; (c) Partie latérale de l'image du plan de Fourier; (d) Image résultante lorsque seules les hautes fréquences de l'espace K sont gardées – modifié de imaios.com

1.6.1.5 Cartographie des temps de relaxation

Les acquisitions des cartographies en T_1 et en T_2 sont exécutées lors de diastoles cardiaques.

Pour calculer le temps de relaxation T_2 , plusieurs images sont acquises avec une séquence écho de spin en faisant varier le temps d'écho (TE) pour chaque nouvelle image. Une cartographie du paramètre T_2 est ensuite obtenue en utilisant l'équation (1) [65] (Figure 1.18.a).

$$SI_{(TE)} = SI_{(TE=0)}e^{(-TE/T_2)} \quad (1)$$

où $SI(TE)$ est le signal IRM de l'image, TE est le temps d'écho en millisecondes et le temps de relaxation T_2 cherché en millisecondes.

Pour calculer le temps de relaxation T_1 , plusieurs images sont acquises en faisant varier le temps d'inversion (TIn) pour chaque nouvelle image. Une cartographie du paramètre T_1 est ensuite obtenue en utilisant l'équation (2) [65] (Figure 1.18.b).

$$SI_{(TIn)} = SI_{(TI=0)}(1-2e^{(-TIn/T_1)}) \quad (2)$$

où $SI(TIn)$ correspond au signal IRM de l'image, TIn est le temps d'inversion en millisecondes et le temps de relaxation T_1 cherché en millisecondes.

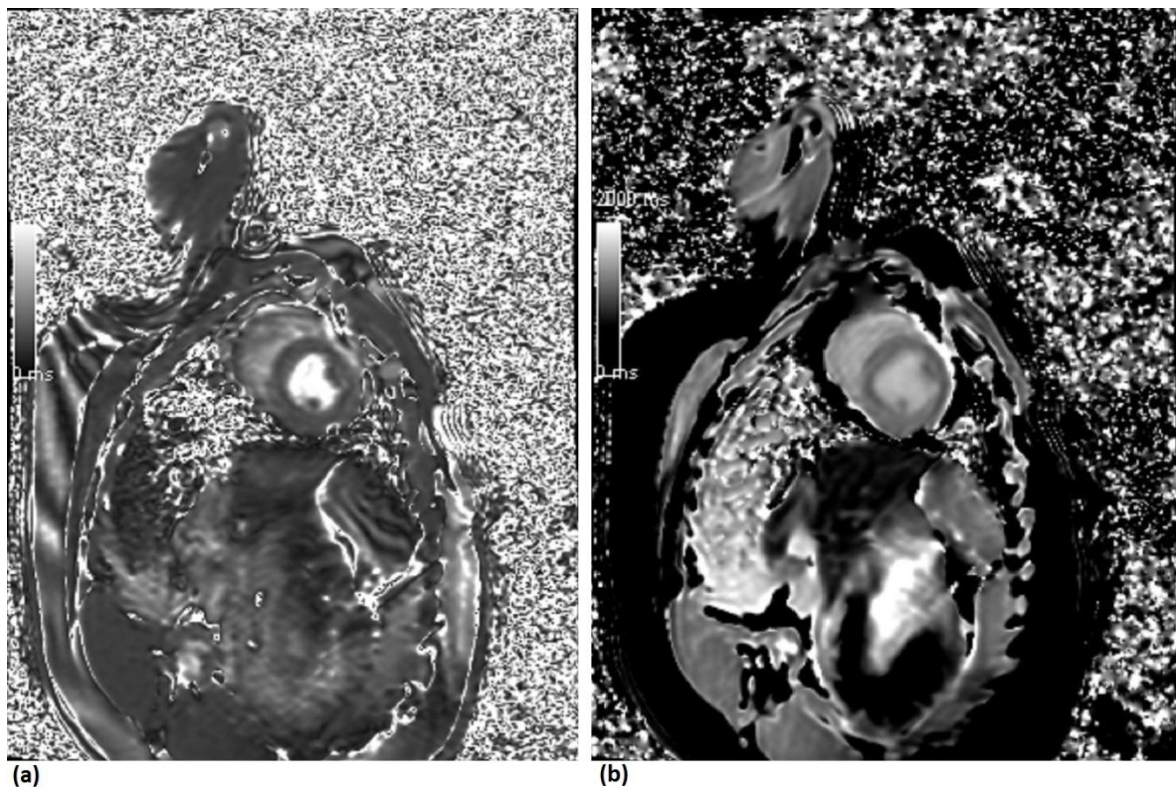


Figure 1.18 - Cartographie T_2 (a) et T_1 (b) à mi-hauteur des ventricules pour un même sujet, lors d'une même acquisition

1.6.2 Qualité des images et artéfacts

La qualité d'une image est déterminée par sa résolution spatiale et son contraste. Ceux-ci peuvent être altérés par plusieurs facteurs, en particulier par le bruit ou différents artéfacts. Lors de l'acquisition d'images, l'apparition d'artéfacts de diverses origines s'observe, il est alors primordial d'avoir une bonne compréhension des phénomènes physiques pour les détecter et les comprendre. L'interprétation des images n'est réalisable qu'avec une connaissance suffisante des possibles artéfacts afin d'obtenir le diagnostic le plus juste.

1.6.2.1 Bruit

L'un des buts des chercheurs et ingénieurs qui travaillent à l'amélioration des séquences IRM est d'augmenter le rapport signal/bruit des images obtenues. En effet le bruit est un signal parasite qui vient s'ajouter au signal réel de l'image. Il a donc pour résultat de rendre difficile l'interprétation de l'image et de fausser les calculs réalisés à partir de ce signal aliéné. Le bruit peut provenir de facteurs non modifiables, comme les caractéristiques tissulaires, ou bien modifiables, comme l'antenne utilisée ou les différents paramètres de séquences.

Pour pallier au problème du bruit, il est donc possible de modifier la séquence utilisée, en fonction de l'endroit à imager et même de la maladie présumée, et ainsi obtenir des images personnalisées et de meilleure qualité. Par exemple, il est possible de changer la taille d'un voxel. En allongeant sa taille, on obtient plus de signal sur l'image résultante, par contre cela suppose une densité constante de protons à imager dans la zone que couvre le voxel. On peut aussi augmenter le nombre d'excitations de la partie à imager en répétant les mesures sur une même coupe. En effet, le signal d'une mesure à l'autre étant identique tandis que le bruit est aléatoire, la quantité de signal va augmenter proportionnellement au nombre de répétitions alors que le bruit augmente de manière logarithmique donc beaucoup plus lentement. La quantité de signal va donc augmenter, cependant accroître le nombre de répétition a pour effet d'augmenter le temps d'acquisition. Le travail des différents acteurs d'un projet est donc de définir les paramètres optimaux en fonction du patient et de l'utilisation souhaitée des images.

1.6.2.2 Artéfacts de mouvement

L'origine d'artéfact la plus fréquente est le mouvement du patient, dû au patient lui-même ou aux vibrations de la machine. Ce sont essentiellement des mouvements effectués entre deux répétitions au cours du codage de phase qui perturbent l'image, car le codage en fréquence est si rapide que les mouvements physiologiques seront imperceptibles. Ces artéfacts de mouvements sont facilement visibles à la fin de l'utilisation d'une séquence, pour certains, ils peuvent être corrigés soit par recalage, soit en réitérant l'acquisition. En ce qui concerne les mouvements périodiques comme la respiration ou le rythme cardiaque, il existe des méthodes de synchronisation ou bien, sur certaines séquences, le problème est contourné en demandant au patient d'effectuer une apnée.

1.6.2.3 Repliement (Aliasing)

Le phénomène de repliement est visible sous forme d'une superposition d'un objet hors du champ de vue lorsque l'objet à imager est plus petit que ce champ (Figure 1.19.a). Cette superposition provient du fait que le codage spatial, en phase (CP) ou en fréquence (CF), donne aux structures hors champ, le même codage que celles qui leur sont opposées (Figure 1.19.b).

© IMAIOS 2015

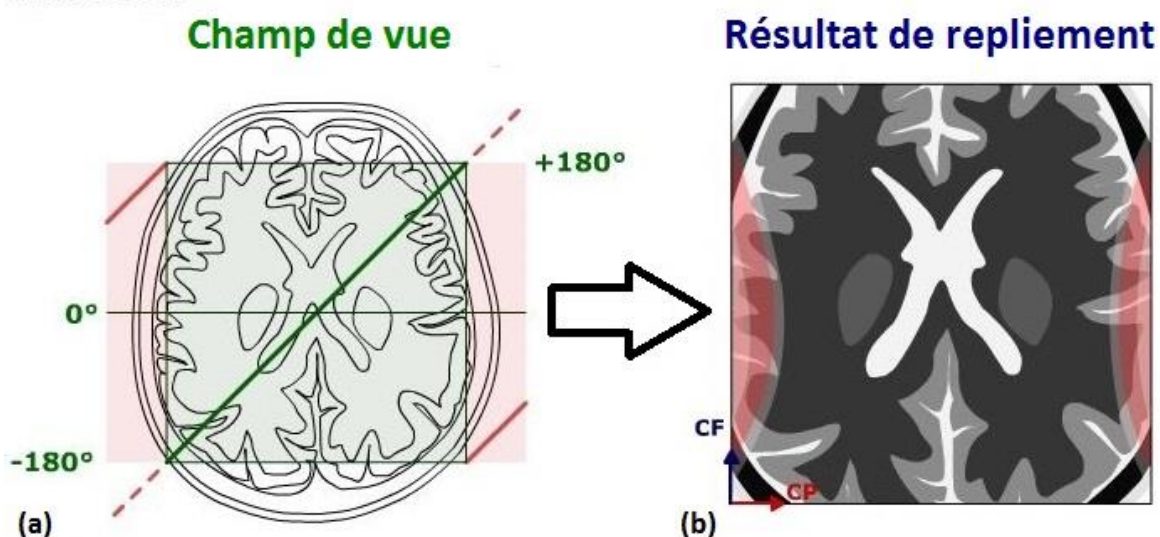


Figure 1.19 - Illustration du phénomène d'aliasing. (a) Un champ de vue donné; (b) image résultante du champ du vue choisi – modifié de imaios.com

Dans la direction de la fréquence, il est facile de supprimer ce phénomène grâce à un filtre passe-bas sans contrepartie pour la qualité ou le temps d'acquisition. À l'inverse, dans la direction de la phase, le phénomène est plus délicat à éviter et des compromis doivent être faits pour obtenir des images de bonne qualité relativement aux spécifications du projet. Afin de supprimer le repliement, la meilleure solution reste d'inclure au champ de vue toute la région anatomique étudiée. Cette méthode diminue la résolution spatiale qui peut être rétablie en augmentant le nombre de répétitions, mais ce qui allonge le temps d'acquisition. Aujourd'hui la plupart des machines IRM permettent le compromis suivant : augmentation de la taille du champ de vue dans la direction du codage de phase pour conserver la résolution tout en réduisant le nombre d'excitation pour éviter un temps d'acquisition allongé mais au détriment du rapport signal/bruit, puis l'image n'est reconstruite que sur la zone d'intérêt réduisant aussi le temps d'acquisition.

1.6.2.4 Troncature

L'artéfact de troncature est engendré par un changement abrupt de signal dans une image et se caractérise par l'apparition de lignes parallèles aux contours de la structure contrastée. Le problème vient de la reconstruction de l'image par transformée de Fourier qui ne peut pas représenter un signal carré avec un nombre fini de fréquences puisque la théorie en demande une infinité. Une solution est d'augmenter le nombre d'échantillons mesurés en augmentant la taille de la matrice, permettant ainsi d'obtenir de plus petites variations dans le signal reconstruit qui est donc plus fidèle à la réalité, mais ceci est au détriment du temps d'acquisition et du rapport signal sur bruit.

1.6.3 Application cardiaque : Ciné-IRM

L'étude du cœur par IRM a connu de nombreuses difficultés en particulier en raison de la mobilité des tissus qui causent des artéfacts sur les images. De nouvelles techniques ont donc dû être développées afin de parer à ce problème. Dans le cas de l'imagerie cardiaque, deux approches sont envisageables: les séquences d'acquisition rapides, et la synchronisation au mouvement. C'est cette deuxième stratégie qui est couramment utilisée. Le cycle cardiaque est divisé en plusieurs phases et la séquence IRM est établie de sorte que les acquisitions soient

toujours réalisées exactement au même moment du cycle [66-69] La synchronisation se fait avec l'électrocardiogramme (ECG) pendant l'examen IRM. Elle peut être effectuée soit prospectivement soit rétrospectivement.

Dans le cas de la synchronisation rétrospective, l'acquisition IRM est continue et le signal ECG est enregistré simultanément, ce qui permet ensuite de réordonner les images à reconstruire: c'est le gating rétrospectif. Le gradient de codage de phase change lorsqu'une nouvelle onde R de l'ECG est détectée. On peut aussi appeler cette technique le mode multi-coupes entrelacées (Figure 1.20). Grâce à cette synchronisation rétrospective, les artefacts de mouvements sont limités et il est possible d'imager la totalité des différentes phases du mouvement cardiaque [66-69].

Gating prospectif (déclenchement de l'acquisition après un délai fixe par rapport à l'onde R)



Gating rétrospectif (Recalage des données dans le cycle cardiaque après l'acquisition)

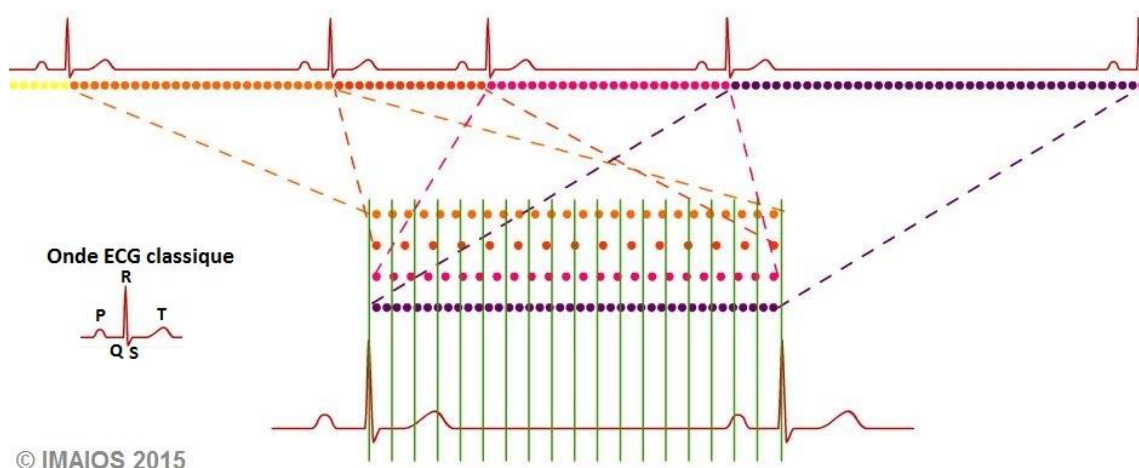


Figure 1.20 - Schématisation de la méthode de Gating Rétrospectif– modifié de imaios.com

Un autre mouvement problématique dans l'acquisition d'images cardiaques est celui du diaphragme qui vient modifier la position du cœur à chaque respiration. Pour éviter ce problème, les séquences IRM sont lancées pendant une apnée du patient. Cependant, il est nécessaire de demander au sujet une apnée en fin d'expiration. Le volume d'air inspiré variant

d'une inspiration à l'autre, le cœur ne se retrouve pas placé exactement au même endroit à la fin de chaque inspiration [67], tandis qu'une apnée en fin d'expiration permet de retrouver la même position du muscle cardiaque.

Les séquences ciné sont en réalité des séquences écho de gradient ultra-rapide avec un bon rapport signal sur bruit et un contraste permettant une bonne distinction entre le sang, en hypersignal (blanc sur l'image), les parois myocardiques, en isosignal (gris sur l'image), et la graisse, en hyposignal (noir sur l'image) [66-69]. Le gating prospectif est réalisable, mais le gating rétrospectif lui est préféré afin d'améliorer la résolution temporelle.

Tout comme en échocardiographie, l'IRM cardiaque standard utilise les plans de coupe suivants: 4 chambres, 2 chambres et court axe (Figure 1.21).

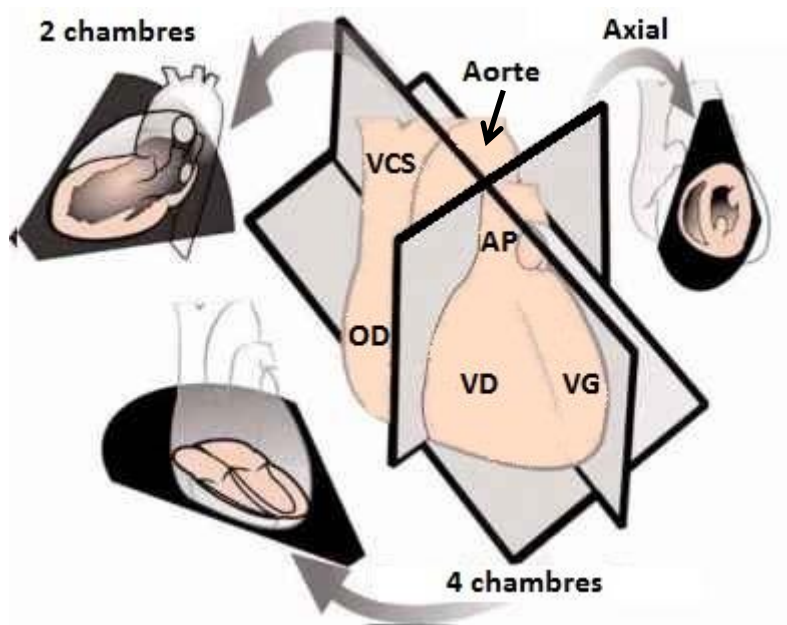


Figure 1.21 - Plans de coupe usuels en imagerie cardiaque– modifié de centrallakesclinic.biz

1.6.4 Application cardiaque : Relaxométrie

Beaucoup d'études expérimentales utilisent l'IRM multiparamétrique pour la détection des dégradations tissulaires car il a été remarqué que les paramètres magnétiques étaient reliés aux changements induits dans les tissus biologiques, ce qui permet de caractériser ces transformations. Dans les études cardiaques, le temps de relaxation transversale T2 a été associé à la présence d'ischémie cardiaque [70], dans laquelle les cellules cardiaques meurent au fur et

à mesure à cause d'une réduction de la circulation sanguine dans le cœur qui empêche la bonne oxygénation de celui-ci. Le temps T2 permet aussi de détecter d'autres troubles cardiaques dus à un changement dans le contenu en eau [71-77]. Un haut temps de relaxation longitudinal T1 se trouve associé à la réduction de la fonction systolique [78] ou chez des patients souffrant d'œdème myocardique ou d'une déposition de protéine. Un faible temps T1 est quant à lui associé à un dépôt de lipide ou de fer [79]. D'autre part, la cartographie du paramètre T1 réalisée après utilisation d'un agent de contraste peut être utilisée pour la détection de fibrose diffuse [70, 78, 80-82], à savoir une inflammation chronique qui vient remplacer la MEC par un tissu fibreux, dense et dur altérant la fonction cardiaque. De plus, notre équipe a démontré que ces paramètres IRM T1 et T2 permettaient de caractériser les propriétés mécaniques du myocarde [83]. L'utilisation de l'IRM multiparamétrique est fréquente pour le diagnostic précoce de dégénérescences telles qu'il en apparait dans le cartilage ou le disque intervertébral grâce aux liens entre les propriétés biochimiques et histologiques et les paramètres magnétiques [84-86]. Cependant, l'évaluation de ces paramètres, qui pourrait permettre de poser un diagnostic précoce sur une dysfonction du muscle cardiaque précédant l'apparition d'une incompetence fonctionnelle, n'a pas encore été examinée.

1.6.5 Application cardiaque : IRM de perfusion myocardique

Ce type d'image est réalisé par l'injection d'un agent de contraste, tel que le gadolinium, qui a pour effet de modifier le temps de relaxation T_1 [87, 88]. L'acquisition se fait par des séquences de pondération T_1 en mode multi-coupes entrelacées, comme vu précédemment, et en apnée afin de garder un bon contraste et une résolution spatiale et temporelle suffisante. Environ 10 minutes après l'étude de la perfusion myocardique tissulaire de premier passage, une autre acquisition d'images pondérées en T_1 est effectuée. Il est important de noter que les résidus de gadolinium ont tendance à se retrouver en plus grande quantité dans les tissus pathologiques comparativement aux tissus sains [55]. Ces images de rehaussement tardif peuvent alors montrer la présence de certaines cardiomyopathies [87, 89, 90].

CHAPITRE 2 ARTICLE 1 : EARLY DETECTION OF DOXORUBICIN CARDIOTOXICITY IN THE SWINE BY CARDIAC MAGNETIC RESONANCE IMAGING

2.1 Présentation de l'article

L'article présenté dans ce chapitre répond aux hypothèses posées dans le chapitre précédent. Il est constitué d'une introduction faisant l'état de l'art des différentes notions nécessaires à la bonne compréhension des résultats, d'une présentation de la méthode utilisée ainsi que celle des résultats, puis ceux-ci sont discutés avec l'exposition des différentes limites de l'étude et leurs contributions.

Cet article, intitulé "Early Detection of Doxorubicin Cardiotoxicity in the Swine by Cardiac Magnetic Resonance Imaging", a été soumis à la revue "Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance" en Juin 2016. La contribution du premier auteur à la préparation et à la rédaction de l'article est évaluée à 75%.

2.2 Early Detection of Doxorubicin Cardiotoxicity in the Swine by Cardiac Magnetic Resonance Imaging

Title: Early detection of doxorubicin cardiotoxicity in the swine by cardiac magnetic resonance imaging

Clémence Balosetti

Mechanical Engineering, Polytechnique Montreal, 2500 Chemin Polytechnique, Montréal (Québec), H3T 1J4, Canada.

clemence.balosetti@gmail.com

Daniel Curnier

Kinesiology, Université de Montréal, 2100 boul. Édouard-Montpetit, Montréal (Québec), H3T

1J4, Canada.

daniel.curnier@umontreal.ca

Hélène Héon

Centre de recherche du Centre hospitalier de l'université de Montréal (CRCHUM), 900 rue Saint-

Denis, Montréal (Québec), H2X 0A9, Canada.

helene.heon.chum@ssss.gouv.qc.ca

Nagib Dahdah

Cardiology, Pediatrics, CHU Sainte-Justine, 3175 chemin Côte Sainte-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada.

nagib.dahdah.hsj@ssss.gouv.qc.ca

Farida Cheriet

Computer and Software Engineering, Polytechnique Montreal, 2500 Chemin Polytechnique, Montréal (Québec), H3T 1J4, Canada.

farida.cheriet@polymtl.ca

Matthias G. Friedrich

McGill University, 3605 Rue de la Montagne, Montréal (Québec), H3G 2M1, Canada.

mgwfriedrich@gmail.com

Delphine Périé (*Corresponding author*)

Mechanical Engineering, Polytechnique Montreal, 2500 Chemin Polytechnique, Montréal (Québec), H3T 1J4, Canada.

delphine.perie@polymtl.ca

2.2.1 Abstract

Purpose: Cancer chemotherapy is an effective treatment to treat cancer in both adults and children. However, the associated cardiotoxicity of doxorubicin, the most commonly used anticancer agent, is a well-known serious side effect leading to long-term morbidity. The objectives of this study were to simulate doxorubicin-induced cardiotoxicity in the miniature swine and to assess the utility of a novel cardiovascular MR (CMR) imaging protocol to detect this cardiotoxicity. We hypothesised that CMR can detect early damages induced by doxorubicin.

Methods: Female Yucatan miniature swine received either a chemotherapy treatment using doxorubicin (doxorubicin group, $n=5$, 5 doses of 75mg/m^2 , 3 weeks interval) or saline (control group, $n=2$). Three MRI scans and three echocardiography exams were performed before the 1st injection (A1), after the 4th injection (cumulative dose 300mg/m^2) (A2), and 3 weeks after the last injection (A3). Hematology lab results, clinical signs, echocardiography measures and CMR parameters were compared between groups and acquisitions. The CMR parameters included the cumulative displacement of each point along the myocardial contour, the normalized ventricular area, wall thickness, and length of the left and right ventricles, the left ventricular (LV) torsion, the von Mises cumulative strains and stresses, as well as the relaxation times T1 (pre and post gadolinium) and T2.

Results: The miniature swine from the doxorubicin group developed alopecia, suffered from diarrhea some days after each doxorubicin infusion and presented decreased white blood cells and platelets. In echocardiography, reductions of shortening fraction, ejection fraction and aortic blood flow were apparent at the last exam in the doxorubicin group, while results remained constant in the control group. From cine-CMR, areas, lengths, thicknesses and LV torsion presented similar patterns along the cardiac cycle, but with different amplitudes between acquisitions and groups. For the LV end-diastolic cumulative displacements, the curve amplitude increased from A1 to A3 in the control group while it remains constant in the doxorubicin group. Cumulative von-Mises strain decreased at A3 in systole and late diastole in the doxorubicin group but stayed constant in the control group. T1pre decreased from A1 to A3 in the control group. T1post decreased from A1 to A3 in both control and doxorubicin groups. T2 decreased from A1 to A3 in the doxorubicin group.

Conclusion: The CMR parameters we investigated in the miniature swine therapeutic model with doxorubicin were able to discriminate treated animals from controls. Differences were detectable earlier than onset of classical echocardiographic changes. Translating these observations to a personalized medicine approach could be the premise for the oncologist to know accurately when the treatment just starts to have deleterious effect on myocardium instead of just observing that the heart was damaged by doxorubicin. The miniature swine therapeutic model would help cardiologists and oncologists to develop early, specific and even preventive therapeutic interventions.

Keywords: Cardiotoxicity, Doxorubicin, Miniature Swine, Cardiac Magnetic Resonance (CMR) Imaging, Cine-MRI, Relaxation Time, Cardiac Function.

2.2.2 Background

Cancer chemotherapy was proven beneficial for solid tumors and acute leukemia in both adults and children [1]. Nevertheless, the associated cardiotoxicity of doxorubicin, the most commonly used anticancer agent, is a well-known serious side effect and among the most important aetiologies of long-term morbidity [1]. Doxorubicin-induced cardiomyopathies are considered irreversible and prevention strategies are preferred [2]. The probability of developing a cardiac side effect, specifically heart failure, following doxorubicin treatment is proportional to the cumulative administered dose [3].

Doxorubicin can cause either morphological changes of the heart, such as myofibril loss and diffuse fibrosis formation, or functional changes, such as reduced ventricular function [4]. These changes are often seen early (less than one year after treatment), particularly in patients receiving high dosage of agent [5, 6], while other patients may experience late lesions of the heart several years after treatment [5, 7].

The clinical assessment of heart failure can use both electrocardiography (ECG) and echocardiography. For a more detailed diagnosis, echocardiographic measurements are made in M-mode, 2D-Mode and Doppler mode, including left ventricular end-diastolic and end-systolic dimensions, fractional shortening, ejection fraction, contraction time, ventricular ejection time and blood velocities through valves. However, these measures are late markers of functional changes that appear only once the cardiomyopathy is advanced [8].

Cardiovascular MR (CMR) Imaging has become the gold standard for non-invasively quantifying global in vivo heart function with measures such as ejection fraction, cavity volume and mass [9-15]. However, conventional CMR techniques are neither capable of quantitatively measuring regional cardiac function nor regional wall motion.

Myocardial tissue displacements are usually obtained from contours-based tracking methods [14] but are not sufficient to infer on tissue internal displacements. Therefore, several imaging sequences and models have been proposed to track deformation including phase-based strain imaging sequences [16-20], but are limited by their low resolution and long processing time.

The transverse or spin-spin relaxation time T2 refers to the progressive dephasing of spinning dipoles following the radio-frequency pulse due to tissue-specific characteristics. T2 is significantly increased in infarcted myocardium [21], and can be used to detect acute ischaemic or non-ischaemic injury due to associated changes in myocardial free water content [22-28].

The longitudinal or spin-lattice relaxation time T1 measures how quickly the net magnetisation vector recovers to the principal magnetic field direction. A higher native myocardial T1 was found in patients with reduced systolic function [29], oedema or protein deposition, while low T1 values were found to reflect lipid or iron deposition [30]. When using gadolinium as a contrast agent, T1 mapping of late enhancement is found to detect accurately myocardial diffuse fibrosis [31, 32] or fibrosis scar [33, 34] .

Several animal models were used to study the effect of doxorubicin. Heart structure and function are similar in all mammals [35] which allows, under certain circumstances, to extrapolate the results provided by an animal study to the human. Small animals such as mice or rats are widely used in toxicology. However, rats and mice doxorubicin reaction involves lesions to non-cardiac organs, including kidney, liver and small intestine [36], that may occur simultaneously or before cardiotoxicity and interfere with the study outcome [37]. Furthermore, because of different repolarisation mechanisms, pharmacological security addressing arrhythmia issues did not use small animals [38].

The miniature swine is of particular interest for the study of doxorubicin cardiotoxicity because it is possible to use a treatment regimen similar to those used in a clinical setting. The miniature swine presents similarities to humans regarding cardiac anatomy, metabolism, and pathophysiology [39]. Cardiac volumes and mass, coronary vascular architecture and function of humans are more similar to miniature swine than to dogs or non-human primates [39-41]. The chemotherapy treatment will provoke damages and side effects similar to those observed in humans [42]. Besides the cardiotoxicity, the principal other adverse reaction is a myelosuppression. The digestive system presents some anatomic differences between miniature swine and humans, but the physiology is similar [39]. Therefore digestive troubles caused by doxorubicin in human are also observed in miniature swine receiving the drug [42].

The objectives of this study were to simulate doxorubicin-induced cardiotoxicity in the miniature swine and to assess the utility of a novel CMR Imaging protocol to detect this cardiotoxicity. We hypothesised that CMR can detect early damages induced by doxorubicin.

2.2.3 Methods

2.2.3.1 Animal protocol

Our protocol (Figure 2.1), approved by the Animal Care Committee of our institution, was designed to simulate the chemotherapy treatment applied to young adolescents. The cardiovascular system growth of miniature swine from zero to four months old is similar to human's growth from birth to mid-adolescence [41]. All manipulations required for the project were completed at the animal care facilities of our institution.

Seven female Yucatan miniature swine, 3.5-4 months old, were purchased from Sinclair Bio-Resources (Columbia, Missouri, USA). They were kept in housing units and provided with water and nutritionally balanced feed ad libitum throughout the whole study. Two vascular access ports (Polysulfone Maxi CleaPort and 5Fr IntiSil Silicone Catheter, Access Technologies, Skokie, IL, USA) were implanted in each miniature swine on the right and left superior vena cava following the acclimation period. Vascular access ports were flushed weekly under aseptic conditions with saline and 2, 5 ml of a taurolidine locking solution. All injections required for the project were done through these vascular access ports.

Five miniature swine were randomly assigned to the doxorubicin group, receiving the chemotherapy treatment. The remaining two miniature swine were assigned to the control group, receiving saline. All doxorubicin or saline injections, echocardiographic and CMR evaluations were performed under general anesthesia. The animal was sedated with isoflurane (2%) administered with a face mask, and ketamine 2mg/kg and midazolam 0.033mg/kg were administered intravenous through the vascular access ports. The animal was intubated and general anesthesia was maintained with isoflurane (1-2%) and oxygen (FiO₂ 100%). Atropine 0.01mg/kg was administered if the animal had a cardiac frequency under 60bpm. Meloxicam 0.3mg/kg was administered sub-cutaneous. Our doxorubicin injection protocol was designed according to Herman and Ferrans [42]. Five doses of 75mg/m² (corresponding to 2.4mg/kg in children) were administered, at a three weeks interval, for a total cumulative dose of 375mg/m², which is considered a high dosage in children and adolescents (dose > 300mg/m²). The lyophilized doxorubicin was diluted in 2mg/mL of sodium chloride according to standards. Doxorubicin infusions lasted at least one hour. The animals received 1 dose (0.1mg/kg) of ondansetron intravenous at the end of the infusion and the medication was prolonged per os (4mg/kg) for 2 to 3 days to help controlling vomiting. Complete blood count was performed

one week prior to each doxorubicin injection to ensure the neutrophil count was not inferior to 2000 cells/ μ l and the platelet count not less than 50000 cells/ μ l [43]. No treatment had to be postponed.

Three CMR acquisitions were performed along with three echocardiographies. The first acquisition (A1) was done before the first injection for intra-animal control values. The second acquisition (A2) was done after the fourth doxorubicin injection, when the cumulative dose was 300mg/m². The last acquisition (A3) was done three weeks after the last injection.

After the last acquisitions, the animals were sacrificed with a barbiturate overdose (108mg/kg). The heart and other organs (liver, kidney, carotid, abdominal aorta, skeletal muscle, lung and diaphragm), which might potentially be damaged by the cytotoxic drug, were collected and samples were preserved either in liquid nitrogen or in formalin for future studies.

2.2.3.2 Echocardiography

Echocardiography was performed on a portable Vivid-i (GE Healthcare, Wauwatosa, WI) with probe frequencies adapted to the body size of the young miniature swine. Measurements were performed according to the recent ASE recommendations [44, 45].

M-mode data included heart rate, left ventricle (LV) diameter in diastole, right ventricle (RV) diameter in diastole, left ventricular shortening fraction, pulmonary valve annulus, aortic valve annulus, aortic flow velocity and pulmonary flow velocity.

Doppler tissue imaging was acquired from the apical 4-chamber, 3-chamber, and 2-chamber views. The image position, depth, and sector width were optimized for frame rate and insonation angle. Left ventricular ejection fraction measured according to the modified biplane Simson's rule. Tissue Doppler measurements included early (E), atrial (A), and systolic (S) myocardial velocities at the lateral mitral annuli. Diastolic function parameters included E/E' lateral wall (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the lateral wall of the left ventricle), E/E' septum (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the interventricular septum) and E/A (mitral E wave peak velocity / A wave peak velocity). Atrioventricular inflow and ventricular outflow Doppler tracings of the RV and LV were analyzed to measure isovolumetric relaxation time, isovolumic

contraction time, and ventricular ejection time and calculate the myocardial performance index (MPI) from these values.

2.2.3.3 CMR

CMR acquisitions were performed on a 3T MRI scanner (Skyra, Siemens, Erlangen, Germany) using a 18-channel phased array body matrix coil.

Cine images were acquired with an ECG-gated cine TruFISP sequence. This sequence was chosen because of its reliable image quality. 11 slices were acquired in mid-ventricular short-axis (slice thickness 6 mm, repetition time 37.2s, effective echo time 1.63s, flip angle 48°, matrix 174×208 and spatial resolution $1.05\text{mm} \times 1.05\text{mm}$). For each slice, 30 phases of the cardiac cycle were acquired during multiple breath-holds. 6 slices were acquired in long axis 2-chamber and 4-chamber views (slice thickness 6 mm, repetition time 40.15s, effective echo time 1.59s, flip angle 48°, matrix 192×208 and spatial resolution $1.15\text{mm} \times 1.15\text{mm}$). For each slice, 25 phases of the cardiac cycle were acquired during multiple breath-holds.

The relaxation times were acquired consecutively to the cine acquisition, at end of diastole to avoid cardiac motion artefacts. A MOLLI sequence was used for T1 mapping [46] and a T2-prepared TrueFISP sequence for T2 mapping [47]. Post-gadolinium T1 images were acquired using ProHance (0.2ml/kg, Bracco, USA) as a contrast agent.

2.2.3.4 Analysis of Cine-CMR

The analysis of the displacements was performed according to Aissiou *et al.* [48]. Myocardial contours were semi-automatically segmented on one axial slice at mid-ventricular level (Figure 2.2), for each of the 30 phases, using an interactive implementation of cubic Bezier curves. Contours were smoothed using geometrical kriging [49] and parametrized using percentage of cumulative length. For each point along the myocardial contour, the absolute displacement at each cardiac cycle phase was added cumulatively. Normalized ventricular area, wall thickness, and length of the left and right ventricles, and LV torsion were also calculated. Normalization was done by dividing each parameter by the maximum value reached during the overall cardiac cycle.

Strain and stresses were analysed according to Aissiou *et al.* [50]. An isotropic hyperplastic model with a discrete distribution of Young's Modulus [51] was used. The cardiac cycle was divided into systole, early diastole (ED) and late diastole (LD). Myocardial geometry was meshed into 2D unstructured triangular elements [52]. Intra-myocardial displacements were injected as loading conditions. Von Mises strains and stresses were estimated at each phase and cumulatively added through the cardiac interval.

2.2.3.5 Analysis of Myocardial Relaxation Times

T1 and T2 maps were generated and analysed as previously published [53]. T1 and T2 maps were segmented using the same interactive implementation of cubic Bezier curves as for the cine-images. T1 maps were generated using phase sensitive inversion recovery (PSIR) fitting using a three parameter signal model with motion correction [46]. Pixel-wise myocardial T2-maps were generated using unsupervised curve-fitting based on a two-parameter equation with motion correction [47]. Resulting T1 and T2 relaxation times were displayed using a bullseye plot that illustrate T1 and T2 relaxation times mean for each left ventricle segment [54]. This regions organisation was introduced in Fetterman's work [55].

2.2.3.6 Statistical Analysis

A two-ways analysis of variance was performed on all MRI relaxation times and cine-MRI parameters, the first way being the group (doxorubicin versus control) and the second way being the acquisition (A1: pre-treatment, A2: after the 4th injection, and A3: after the last injection). As more than one measure was performed on each animal (all pixels for relaxation times or 100 measures along the cardiac cycle for cine data), we were not able to use a repeated measure test, except for the mean relaxation times in each segment. A Krustal-Wallis one-way ANOVA on ranks (for each group between the acquisitions or for each acquisition between groups) was used when the normality test failed.

2.2.4 Results

2.2.4.1 Clinical aspects

Only the miniature swine from the doxorubicin group developed alopecia and suffered from diarrhea a few days after each doxorubicin infusion. As expected, a transitory neutropenia and thrombocytopenia was observed following each doxorubicin infusion. Both parameters had returned to normal prior to the next scheduled drug administration. All miniature swine in the doxorubicin group developed a progressive non-regenerative anemia.

The animals from the doxorubicin group demonstrated a smaller weight gain (18 ± 5 kg) than the control group (25 ± 3 kg), with a stabilized weight since the 4th injection in the doxorubicin group while still increasing until the end of the study in the control group.

One of the two vascular access ports was removed between the 4th and 5th injection in one of the control miniature swine because of a thrombotic occlusion. This animal developed an infection at the surgical site that was successfully treated with enrofloxacin. It received the fifth injection according to the protocol.

One of the miniature swine from the doxorubicin group died of septic shock 9 days after the 4th doxorubicin injection. Another animal from the doxorubicin group developed fever and a profound apathy and was euthanized for humane reasons 14 days after the 5th injection of doxorubicin. We performed a CMR and an echocardiography before euthanasia. Sample size in the doxorubicin group was therefore $n=5$ for the first and second acquisitions and $n=4$ for the third acquisition.

2.2.4.2 Echocardiography

Shortening fraction, ejection fraction (Figure 2.3.a) and aortic blood flow (Figure 2.3.b) decreased (9.4%, 12.6% and 15.8% respectively) at the last acquisition in the doxorubicin group, while remaining constant in the control group. The area of the aortic valve annulus increased more from A1 to A3 in the control group (18.6% difference) than in the doxorubicin group (12.3% difference). Septal E/E' ratio decreased (59.2%) from A1 to A3 in the control

group but not in the doxorubicin group (2.4% difference) (Figure 2.3.h). However, differences between acquisitions and between groups were not significant in all these parameters ($p>0.05$).

2.2.4.3 mpMRI: cine-MRI

For all areas, lengths and thicknesses, all curves from the 3 acquisitions (A1, A2, A3) and the 2 groups (doxorubicin and control) presented similar patterns along the cardiac cycle (Figures 2.4 and 2.5).

For LV length and area (Figure 2.4.a), the curves from the 3 acquisitions of the control group had the same amplitude as the curve from A1 of the doxorubicin group while the curves from A2 and A3 of the doxorubicin group presented higher amplitude (37.8% for area and 13.4% for length). Significant differences ($p<0.001$) were found between groups in A2 and A3, between A1 and A2 or A3 within the doxorubicin group, and between A2 and A3 within the control group.

For RV length and area (Figure 2.4.b), all curves from the 3 acquisitions and the 2 groups presented similar amplitude, with a tendency to increase the amplitude (10-14%) from A1 to A3 on both groups. Significant differences ($p<0.001$) were found between groups in A1 and A3, between A1 and A2 or A3 within the doxorubicin group, and between A3 and A1 or A2 within the control group.

For all thicknesses (Figure 2.5), the curve amplitude increases from A1 to A3 in the control group (21.1% for the septum, 14.0% for the RV and 18.4% for the LV) while it decreases at A3, or A2 and A3, in the doxorubicin group (12.9% for the septum, 20.1% for the RV and 15.6% for the LV). Significant differences ($p<0.001$) were found between groups in A1 and A2, between A1 and A2 or A3 within both the doxorubicin and control groups.

LV torsion along the cardiac cycle presented a different shape in the doxorubicin group as compared to the control group for all acquisitions (Figure 2.6), decreasing (14.6%) from A1 to A3 in the control group while remaining constant in the doxorubicin group. Significant differences ($p<0.001$) were found between groups in all acquisitions, and between A3 and A1, and between A3 and A2 within control group, with no differences within the doxorubicin group between acquisitions ($p<0.001$).

For LV end diastole cumulative displacements, the curve amplitude increases (18.7%) from A1 to A3 in the control group (Figure 2.7.a) while it remains constant for the 3 acquisitions in the doxorubicin group. This phenomenon appears in the first 60% of the contour, corresponding to the septum and posterior wall of the LV, but is not observed in the RV (Figure 2.7.b). Significant differences ($p < 0.001$) were found between groups in A1 and A3, between all acquisitions within the doxorubicin group, and between A1 and A2 or A3 within the control group.

2.2.4.4 Strain and Stress (CMR)

Cumulative von-Mises strain values decreased at A3 in systole (27.9%) and late diastole (15.0%) in the doxorubicin group but stayed constant in the control group (Figure 2.8). In early diastole no changes were observed in both groups.

For each LV segment, the mean von-Mises stresses decreased from A1 to A3 in the doxorubicin group (52.7% in systole and 35.7% in diastole) while they increased in diastole (45.0%) or remained constant in systole from A1 to A3 in the control group (Figure 2.9). For the septum, similar behaviours were observed in both groups in both diastole and systole.

No significant differences ($p < 0.05$) were found on the mean strains or stresses per segment between groups or between acquisitions.

2.2.4.5 MR Relaxation Times

In Figure 2.10 mean values of T1pre, T1post and T2 have been reported for each segment, throughout the left ventricle. The basal slice is represented in the outer circle, the middle slice in the middle circle and the apex slice in the inner circle. A slight reduction (6.5%) in T1pre measures in the control group was shown from A1 to A3 while no change was seen in the doxorubicin group. A decrease was observed in T1post measures in both control (17.1%) and doxorubicin (24.0%) groups. T2 measures decreased from acquisition 1 to 3 in the doxorubicin group (11.3%) while nothing was visually detectable for the control group.

For all cardiac segments, significant differences ($p < 0.05$) were found on the mean T1post values mainly between A1 and A3, but not between groups ($p > 0.05$). For all cardiac segments, no significant differences ($p > 0.05$) were found between groups nor acquisitions on mean T1pre and mean T2 values.

For T1post, T1pre and T2 and for all cardiac segments, significant differences ($p < 0.001$) were found on all pixels values between groups mainly in A1 and A3, and between mostly all acquisitions in both doxorubicin and control groups.

2.2.5 Discussion

This study showed the feasibility of the proposed protocol to induce cardiomyopathy in young miniature swine by intravenous injection of doxorubicin. Our protocol simulated clinical reality for children and adolescents and indicated a clinical utility of a novel CMR technique to detect cardiotoxicity. The reduced left ventricle ejection found from the last echocardiography in the animals receiving doxorubicin suggests the development of a cardiac dysfunction during the treatment. While this was detected three weeks after the end of the treatment, the CMR parameters we investigated allowed an early detection. More precisely, our proposed parameters discriminated treated animals from controls, at the second acquisition (after a cumulative doxorubicin dose of 300mg/m^2) detecting subtle cardiac changes. Therefore we validated our hypothesis.

Our protocol, 3 weeks interval, 5 doses of 2.4 mg/kg (equivalent to 75mg/m^2), was optimised based on a miniature swine experiment [42] to mimic clinical protocols. In the literature, several research protocols were conducted on pigs receiving only one injection of doxorubicin, to investigate the clearance of doxorubicin [56], the short term effect of a potentially protective drug (cyclosporine, lipiodol) [57], or the skin toxicity and potential pharmacologic antidotes [58]. However, single injections do not lead to acute heart damages. These single injection protocols do not represent the clinical reality, where patients receive repetitive intravenous injections of doxorubicin and develop chronic cardiotoxicity, a linearly correlated effect of the cumulative dose [3]. Other protocols were conducted on pigs receiving repetitive intracoronary injections of adriamycin [59, 60] or intravenous application of doxorubicin [61] every 4-7 days for 3 to 5 weeks to develop experimental cardiomyopathy with selective toxic damage of the left ventricular myocardium. These experimental models do not completely mimic the chronic exposure to the drug in humans, neither. Repetitive doxorubicin injection protocols used in swine were based on $1.5\text{-}2.4\text{mg/kg}$ doses for a total cumulative dose of 9.6mg/kg or 14.4 mg/kg [42] or 7.5mg/kg [61], corresponding to cumulative dose of $300\text{-}450\text{ mg/m}^2$ in the human.

The usual symptoms observed in humans and animal models (alopecia, loss of appetite for one to three days after doxorubicin injection, and digestive disorders) are due to the

pathophysiology of the doxorubicin [1, 62]. Herman and Ferrans [42] also reported loss of hair beginning on the legs and back after the 2nd or 3rd injection, with several animals essentially hairless by the end of their study. The decreased weight gain in the doxorubicin group is in agreement with Cassidy *et al.* [61]. However, Herman and Ferrans reported regular weight gain in all their groups, with no differences between animals receiving doxorubicin and controls [42]. The hematologic effects observed in our doxorubicin group were related to the chemotherapy adverse effects on the bone-marrow [63]. Finally, using intra-venous injection method as it is done in clinics, we did not get skin necrosis obtained from intra-muscular injection [58].

Because doxorubicin weakens the immune system and decreases platelets and neutrophils count, miniature swine following chemotherapy treatment are more prone to develop infections, which could entail the septic shock death or the fever with profound apathy that we reported. Similar death were reported for miniature swine that received either 1 injection of 5 or 9 mg/kg doxorubicine [56], 1-3 injections of 3.2mg/kg doxorubicine [42], or even 5-6 injections of 1.6mg/kg doxorubicine [42].

The decrease of ejection fraction and shortening fraction in our doxorubicin group observed in the last exam corresponds to the finding of Christiansen *et al.* [60] on swine from echocardiography and of Ylänen *et al.* [64] on adolescent cancer survivors from cine-MRI. However, we did not observe a significant increase of left ventricular diameters and volumes at end systole and end diastole as encountered by Christiansen *et al.* [60]. Cassidy *et al.* [61] reported a lower heart rate in the doxorubicin swine group as compared to the control swine group, corresponding to the decrease of the heart rate in our doxorubicin group at the last acquisition. They also reported similar cardiac indices between groups, in accordance to our echocardiography measures. The decreased septal E/E' ratio with the animal's growth in the control group but not in the doxorubicin group indicated a persistently diminished myocardial compliance under doxorubicin.

The increase of the thicknesses and LV end diastole displacements from A1 to A3 in the control group could be explained by the normal growth of the heart. In the doxorubicin group, these parameters remained constant, suggesting that the animals did not grow as well as the control

group, as previously found in the literature [61]. The measure of the weight throughout the study confirmed the reduced growth in the doxorubicin group as opposed to a normal growth curve in the control group. The decrease of ventricular area and length in the doxorubicin group also suggested these parameters as good indicators of the heart health, deteriorated by the doxorubicin.

For area/length and wall thickness, the differences between doxorubicin and control groups were larger at end-systole and during early diastole, when the heart is contracted. Moreover, the differences between doxorubicin and control groups found for the displacement of the septum and the posterior LV wall were evident throughout the cardiac cycle, beginning at the end of systole. Our CMR results do not confirm that diastolic manifestations of doxorubicin cardiomyopathy occurred prior to significant alteration of systolic function, as concluded by Cassidy *et al.* [61]. However, we did not measure their indices of relaxation.

The patterns of LV torsion along the cardiac cycle in our doxorubicin and control groups are similar to the ones of chronic heart failure patients and control volunteers respectively, obtained from strain echocardiography measurements [65]. The constant LV torsion from A1 to A3 in the doxorubicin group might be related to no changes in contractile mechanics [66].

The decrease of the strain and stresses in both systole and diastole phases in our doxorubicin group is in agreement with the decreased cardiac output, stroke volume index, and left ventricular stroke work index found by Christiansen *et al.* [60]. In doxorubicin-treated cancer survivors, strains and stresses were significantly lower, indicating a reduction in myocardial contractile function [50]. However in miniature swine, Cassidy *et al.* found that baseline contractile efficiency was significantly higher in the doxorubicin group than in the control group [61].

As low T1 values were found to reflect lipid or iron deposition in the heart [30], the slight reduction in T1pre measures in the control group from A1 to A3 could be associated to an increased lipid deposition. This lipid deposition in the control group might be associated to the weight gain during the study while the doxorubicin, which limited the weight gain in the doxorubicin group, might have also limited this lipid deposition in the heart. The decrease observed in T1post measures from A1 to A3, more important in the doxorubicin group than in

the control group, might be related to myocardial diffuse fibrosis [31, 32] or fibrosis scar [33, 34], due to the retention of gadolinium contrast in fibrotic tissue that causes T1 shortening. Histology studies by Cassidy *et al.* showed sarcomere disruption and mitochondrial injury associated with myocardial fibrosis [61] while Christiansen *et al.* found predominantly left ventricular myocardial damage characterized by an increase of fibrous tissue [60]. In adolescent cancer survivors, while myocardial fibrosis did not seem to be detectable from cine-MRI at a median of 7.8 years after anthracycline therapy [64], the reduced myocardial T1 and extracellular volume fraction might represent diffuse fibrosis [67]. However, T1post of both doxorubicin and control groups were in the same range as T1post in cancer survivors [53, 67].

With a decreased or constant T2 from A1 to A3, both groups did not present infarcted region [21]. As T2 can be used to detect acute ischemia or other troubles involving changes in myocardial water content [22-28], the slight T2 decrease from A1 to A3 in the doxorubicin group might be associated to decreased water content as compared to the control group. However, no change in the hematocrit count was observed in both groups to confirm a lower hydration in the doxorubicin group than in the control group. T2 can also be associated to a collagen accumulation in the cardiac tissue, which could discriminate a cardiopathology in which the tissue become stiff. T2 of both doxorubicin and control groups were in the same range as T2 in cancer survivors [53, 67]. While volunteers' age was significantly correlated to T2 [68], T2 did not change in our control group, due to the short length of our study (4 months).

The main limitation of the project was the small number of animals inducing a low statistical power. We focused on visual analysis to understand the parameter behaviours. The premature death of one of the miniature swine in the doxorubicin group was another limitation as we missed data for the third acquisition. Cine acquisitions on the porcine were challenging because several animals had a shifted myocardium involving difficulties to find the cardiac planes. Artifacts tended to appear, due to the blood flow in the aorta. Echocardiography on porcine was also challenging because this animal is less echogenic than human due to the sub-cutaneous fat and thorax conformation in pigs. Our segmentation process was only semi-automatic and required about 30 minutes per animal per acquisition. However, the mean intra-observer error was 0.4mm while the mean inter-observer error was 1.4mm for the endocardial and epicardial curves position [48]. The rapid growth of premature animals can affect T1 values. The time interval between the end of treatment (last injection of doxorubicine) and the end of the study

(last acquisition and euthanasia) was limited to 3 weeks because of the decreasing health condition of the animals after the 5th injection. Thus our imaging techniques (MRI and echocardiography) were limited to detect the acute cardiotoxicity of doxorubicine [4].

2.2.6 Conclusion

The CMR parameters we investigated in the miniature swine therapeutic model with doxorubicin were able to discriminate treated animals from controls. Differences were detectable earlier than onset of classical echocardiographic changes. Translating these observations to personalized medicine approach could be the premise for the oncologist to know accurately when the treatment just starts to have deleterious effect on myocardium instead of just observing that the heart was damaged by doxorubicin. The miniature swine therapeutic model would help cardiologists and oncologists to develop early, specific and even preventive therapeutic interventions. This model could be optimized by using lower doses of doxorubicine (50mg/m²) and more imaging acquisitions (every 2 injections).

2.2.7 Declarations

List of abbreviations

Cardiac Magnetic Resonance (CMR)

Electrocardiography (ECG)

Left ventricle (LV)

Right ventricle (RV)

Doxorubicin 1st injection (A1)

Doxorubicin 4th injection (A2)

3 weeks after the last doxorubicin injection (A3)

Early (E)

Atrial (A)

Systolic (S)

Myocardial performance index (MPI)

Early diastole (ED)

Late diastole (LD)

Phase sensitive inversion recovery (PSIR)

Pre-gadolinium longitudinal relaxation time (T1pre)

Post-gadolinium longitudinal relaxation time (T1post)

Transverse relaxation time (T2)

Analysis of variance (ANOVA)

Ethics approval and consent to participate

The protocol was approved by the institutional committee for animal protection of the CRCHUM (CIPA, reference number IM14034DPCp).

Consent for publication

Not applicable, this manuscript does not content any individual person's data or case reports.

Availability of data and materials

The data are not shared as future data analyses are planned.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests related to this study.

Funding

This project was funded by the “Fonds de Recherche du Québec en Nature et Technologies” (Team grant) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery grant).

Authors' contributions

CB: Study management, experiments, image analysis, data analysis and manuscript drafting.

DP, DC: Study design, experiments, data analysis, interpretation of data, revising manuscript.

HH: Animal study design, animal study supervision, interpretation of data, revising manuscript.

MF, ND, FC: Interpretation of data and revising manuscript.

Acknowledgements

We thank the CRCHUM's Animal facility for the treatment and care of the animals.

Authors' information

CB is a MSc candidate in Biomedical Engineering at Polytechnique Montreal.

DC (PhD) is an Associate Professor in Kinesiology at Université de Montréal.

HH (DVM, MSc) is the veterinary at the CRCHUM.

ND (MD) is an associate professor at Université de Montréal and a pediatric cardiologist at the CHU Sainte-Justine.

FC (PhD) is a full Professor in Computer and Software Engineering at Polytechnique Montreal.

MF (MD, PhD) is a full professor in medicine at McGill University and a cardiologist at McGill University Health center.

DP (PhD) is an associate Professor in Mechanical Engineering at Polytechnique Montreal.

2.2.8 References

- [1] J. H. Schellens, H. L. McLeod, and D. R. Newell, *Cancer clinical pharmacology*: Oxford University Press, 2005.
- [2] D. L. Keefe, "Anthracycline-induced cardiomyopathy," *Seminars in Oncology*, vol. 28, Supplement 12, pp. 2-7, 8// 2001.
- [3] G. Takemura and H. Fujiwara, "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management," *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. 49, pp. 330-352, 3// 2007.
- [4] M. Aissioui, D. Périé, F. Cheriet, N. Dahdah, C. Laverdière, and D. Curnier, "Imaging of early modification in cardiomyopathy: the doxorubicin-induced model," *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, vol. 29, pp. 1459-1476, 2013/10/01 2013.
- [5] A. Giantris, "Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults," Elsevier Science Ireland Ltd., 1998.
- [6] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, and L. Gianni, "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity," *Pharmacol Rev*, vol. 56, pp. 185-229, Jun 2004.
- [7] L. J. Steinherz, P. G. Steinherz, C. C. Tan, G. Heller, and M. Murphy, "Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy," *JAMA*, vol. 266, pp. 1672-1677, 1991.
- [8] P. Thavendiranathan, F. Poulin, K. D. Lim, J. C. Plana, A. Woo, and T. H. Marwick, "Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: a systematic review," *J Am Coll Cardiol*, vol. 63, pp. 2751-68, Jul 1 2014.
- [9] I. Eitel, F. von Knobelsdorff-Brenkenhoff, P. Bernhardt, I. Carbone, K. Muellerleile, A. Aldrovandi, et al., "Clinical characteristics and cardiovascular magnetic resonance findings in stress (takotsubo) cardiomyopathy," *Jama*, vol. 306, pp. 277-286, 2011.
- [10] H. Childs, L. Ma, M. Ma, J. Clarke, M. Cocker, J. Green, et al., "Comparison of long and short axis quantification of left ventricular volume parameters by cardiovascular magnetic resonance, with ex-vivo validation," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 13, p. 40, 2011.
- [11] M. Cocker and M. G. Friedrich, "Cardiovascular magnetic resonance of myocarditis," *Current cardiology reports*, vol. 12, pp. 82-89, 2010.
- [12] M. G. Friedrich, U. Sechtem, J. Schulz-Menger, G. Holmvang, P. Alakija, L. T. Cooper, et al., "Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: A JACC White Paper," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 53, pp. 1475-1487, 2009.
- [13] H. Abdel-Aty, P. Boyé, A. Zagrosek, R. Wassmuth, A. Kumar, D. Messroghli, et al., "Diagnostic performance of cardiovascular magnetic resonance in patients with suspected acute myocarditis: comparison of different approaches," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 45, pp. 1815-1822, 2005.
- [14] O. Strohm, J. Schulz-Menger, B. Pilz, K. J. Osterziel, R. Dietz, and M. G. Friedrich, "Measurement of left ventricular dimensions and function in patients with dilated cardiomyopathy," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 13, pp. 367-371, 2001.

- [15] M. G. Friedrich, J. Schulz-Menger, O. Strohm, A. J. Dick, and R. Dietz, "The diagnostic impact of 2D-versus 3D-left ventricular volumetry by MRI in patients with suspected heart failure," *Magma: Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology, and Medicine*, vol. 11, pp. 16-19, 2000.
- [16] X. Zhong, B. S. Spottiswoode, C. H. Meyer, C. M. Kramer, and F. H. Epstein, "Imaging three-dimensional myocardial mechanics using navigator-gated volumetric spiral cine DENSE MRI," *Magnetic resonance in medicine*, vol. 64, pp. 1089-1097, 2010.
- [17] S. Sampath, N. F. Osman, and J. L. Prince, "A combined harmonic phase and strain-encoded pulse sequence for measuring three-dimensional strain," *Magnetic resonance imaging*, vol. 27, pp. 55-61, 2009.
- [18] A. T. Hess, X. Zhong, B. S. Spottiswoode, F. H. Epstein, and E. M. Meintjes, "Myocardial 3D strain calculation by combining cine displacement encoding with stimulated echoes (DENSE) and cine strain encoding (SENC) imaging," *Magnetic resonance in medicine*, vol. 62, pp. 77-84, 2009.
- [19] B. S. Spottiswoode, X. Zhong, A. Hess, C. Kramer, E. M. Meintjes, B. M. Mayosi, et al., "Tracking myocardial motion from cine DENSE images using spatiotemporal phase unwrapping and temporal fitting," *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, vol. 26, pp. 15-30, 2007.
- [20] A. J. Sinusas, X. Papademetris, R. T. Constable, D. P. Dione, M. D. Slade, P. Shi, et al., "Quantification of 3-D regional myocardial deformation: shape-based analysis of magnetic resonance images," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 281, pp. H698-H714, 2001.
- [21] S. Giri, Y. C. Chung, A. Merchant, G. Mihai, S. Rajagopalan, S. V. Raman, et al., "T2 quantification for improved detection of myocardial edema," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 11, 2009.
- [22] H. Abdel-Aty, P. Boyé, P. Bock, A. Kumar, and M. G. Friedrich, "Stenotic mitral valve prosthesis with left atrial thrombus," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 7, pp. 421-423, 2005.
- [23] H. Abdel-Aty, M. Cocker, C. Meek, J. V. Tyberg, and M. G. Friedrich, "Edema as a very early marker for acute myocardial ischemia: a cardiovascular magnetic resonance study," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 53, pp. 1194-1201, 2009.
- [24] H. Abdel-Aty, O. Simonetti, and M. G. Friedrich, "T2-weighted cardiovascular magnetic resonance imaging," *Journal of magnetic resonance imaging*, vol. 26, pp. 452-459, 2007.
- [25] A. E. Arai, "Using magnetic resonance imaging to characterize recent myocardial injury utility in acute coronary syndrome and other clinical scenarios," *Circulation*, vol. 118, pp. 795-796, 2008.
- [26] C. R. Butler, R. Thompson, M. Haykowsky, M. Toma, and I. Paterson, "Cardiovascular magnetic resonance in the diagnosis of acute heart transplant rejection: a review," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 11, p. 7, 2009.
- [27] M. Francone, C. Bucciarelli-Ducci, I. Carbone, E. Canali, R. Scardala, F. A. Calabrese, et al., "Impact of primary coronary angioplasty delay on myocardial salvage, infarct size, and microvascular damage in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: insight

from cardiovascular magnetic resonance," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 54, pp. 2145-2153, 2009.

[28] P. Kellman, A. H. Aletras, C. Mancini, E. R. McVeigh, and A. E. Arai, "T2-prepared SSFP improves diagnostic confidence in edema imaging in acute myocardial infarction compared to turbo spin echo," *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 57, pp. 891-897, 2007.

[29] G. A. Krombach, C. Hahn, M. Tomars, A. Buecker, A. Grawe, R. W. Günther, et al., "Cardiac amyloidosis: MR imaging findings and T1 quantification, comparison with control subjects," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 25, pp. 1283-1287, 2007.

[30] J. C. Moon, D. R. Messroghli, P. Kellman, S. K. Piechnik, M. D. Robson, M. Ugander, et al., "Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: a Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR Working Group of the European Society of Cardiology consensus statement," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 15, p. 92, 2013.

[31] N. Mewton, C. Y. Liu, P. Croisille, D. Bluemke, and J. A. Lima, "Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 57, pp. 891-903, 2011.

[32] L. Iles, H. Pfluger, A. Phrommintikul, J. Cherayath, P. Aksit, S. N. Gupta, et al., "Evaluation of Diffuse Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Cardiac Magnetic Resonance Contrast-Enhanced T1 Mapping," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 52, pp. 1574-1580, 2008.

[33] P. Kellman, J. R. Wilson, H. Xue, M. Ugander, and A. E. Arai, "Extracellular volume fraction mapping in the myocardium, part 1: evaluation of an automated method," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 14, p. 63, 2012.

[34] P. Kellman, J. R. Wilson, H. Xue, W. P. Bandettini, S. M. Shanbhag, K. M. Druey, et al., "Extracellular volume fraction mapping in the myocardium, part 2: initial clinical experience," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 14, p. 64, 2012.

[35] F. L. Meijler and T. D. Meijler, "Archetype, adaptation and the mammalian heart," *Netherlands Heart Journal*, vol. 19, pp. 142-148, 02/22 2011.

[36] F. Mettler, D. Young, and J. Ward, "Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats," *Cancer Research*, vol. 37, pp. 2705-2713, 1977.

[37] J. Robert, "Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls," *Cell Biol Toxicol*, vol. 23, pp. 27-37, Jan 2007.

[38] H. M. Vargas, A. S. Bass, J. Koerner, S. Matis-Mitchell, M. K. Pugsley, M. Skinner, et al., "Evaluation of drug-induced QT interval prolongation in animal and human studies: a literature review of concordance," *Br J Pharmacol*, vol. 172, pp. 4002-11, Aug 2015.

[39] F. Köhn, "Chapter 1. History and Development of Miniature, Micro- and Minipigs," in *The Minipig in Biomedical Research*, C. Press, Ed., ed: Taylor & Francis Group, LLC, 2011-10-03.

[40] G. Bode, P. Clausen, F. Gervais, J. Loegsted, J. Luft, V. Nogues, et al., "The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology," *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 62, pp. 196-220, Nov-Dec 2010.

- [41] M. M. Swindle, A. Makin, A. J. Herron, F. J. Clubb, Jr., and K. S. Frazier, "Swine as models in biomedical research and toxicology testing," *Vet Pathol*, vol. 49, pp. 344-56, Mar 2012.
- [42] E. H. Herman and V. J. Ferrans, "Influence of vitamin E and ICRF-187 on chronic doxorubicin cardiotoxicity in miniature swine," *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 49, pp. 69-77, 1983/07// 1983.
- [43] R. W. Nelson and C. G. Couto, "Complication of cancer chemotherapy. ," *Small animal internal medicine*, vol. chap 80, 1998.
- [44] S. F. Nagueh, C. P. Appleton, T. C. Gillebert, P. N. Marino, J. K. Oh, O. A. Smiseth, et al., "Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography," *Journal of the American Society of Echocardiography*, vol. 22, pp. 107-133, 2009.
- [45] R. M. Lang, M. Bierig, R. B. Devereux, F. A. Flachskampf, E. Foster, P. A. Pellikka, et al., "Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology," *Journal of the American Society of Echocardiography*, vol. 18, pp. 1440-1463, 2005.
- [46] R. Deichmann and A. Haase, "Quantification of T 1 values by SNAPSHOT-FLASH NMR imaging," *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, vol. 96, pp. 608-612, 1992.
- [47] S. Giri, Y. C. Chung, A. Merchant, G. Mihai, S. Rajagopalan, S. V. Raman, et al., "T2 quantification for improved detection of myocardial edema," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 11, p. 56, 2009.
- [48] C. F. Aissiou M., Curnier D., Hafyane T., Friedrich M., Laverdière C., Andelfinger G, Krajcinovic M., Sinett D., Périé D., "Myocardial displacement patterns using cine MRI in doxorubicin-treated children : a PETALE study," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, to be submitted.
- [49] M. Aissiou, D. Périé, J. Gervais, and F. Trochu, "Development of a progressive dual kriging technique for 2D and 3D multi-parametric MRI data interpolation," *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering: Imaging & Visualization*, vol. 1, pp. 69-78, 2013/06/01 2013.
- [50] C. F. Aissiou M., Curnier D., Hafyane T., Friedrich M., Laverdière C., Andelfinger G, Krajcinovic M., Sinett D., Périé D., "Myocardial 2D strain and stress indices in the detection of cardiotoxicity in cancer survivors," *Journal of Biomechanics*, to be submitted.
- [51] H. Ghaemi, K. Behdinan, and A. D. Spence, "In vitro technique in estimation of passive mechanical properties of bovine heart part I. Experimental techniques and data," *Med Eng Phys*, vol. 31, pp. 76-82, Jan 2009.
- [52] D. Engwirda, "MESH2D - Automatic Mesh Generation (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/25555-mesh2d-automatic-mesh-generation>), MATLAB Central File Exchange. Retrieved January 13, 2016," 2009.
- [53] C. F. Aissiou M., Curnier D., Hafyane T., Friedrich M., Laverdière C., Andelfinger G, Krajcinovic M., Sinett D., Périé D. , "Early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity

using myocardial T1 (pre- and post-gadolinium) and T2 relaxation times: a PETALE study," *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, to be submitted.

- [54] A. Lam, "Simplified creation of a bullseye (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/47454-bullseye-plot-zip>), MATLAB Central File Exchange. Retrieved February 02, 2016.," 2014.
- [55] M. Fetterman, "Anaskel written in Matlab," ed. MATLAB Central File Exchange, 2005.
- [56] D. August, Verma, Vaertan, Shah, and Brenner, "An evaluation of hepatic extraction and clearance of doxorubicin," 1995.
- [57] I. R. Dubbelboer, E. Lilienberg, M. Hedeland, U. Bondesson, M. Piquette-Miller, E. Sjogren, et al., "The effects of lipiodol and cyclosporine on the hepatobiliary disposition of doxorubicin in pigs," *Mol Pharm*, Feb 21 2014.
- [58] S. D. Averbuch, G. Gaudiano, T. H. Koch, and N. R. Bachur, "Doxorubicin-induced skin necrosis in the swine model: protection with a novel radical dimer," *J Clin Oncol*, vol. 4, pp. 88-94, Jan 1986.
- [59] J. F. Van Vleet, L. A. Greenwood, and V. J. Ferrans, "Pathologic features of adriamycin toxicosis in young pigs: nonskeletal lesions," *Am J Vet Res*, vol. 40, pp. 1537-52, Nov 1979.
- [60] S. Christiansen, A. Perez-Bouza, G. Schalte, R. D. Hilgers, and R. Autschbach, "Selective left ventricular adriamycin-induced cardiomyopathy in the pig," *J Heart Lung Transplant*, vol. 27, pp. 86-92, Jan 2008.
- [61] S. C. Cassidy, D. P. Chan, D. G. Rowland, and H. D. Allen, "Effects of Doxorubicin on Diastolic Function, Contractile Reserve, and Ventricular-Vascular Coupling in Piglets," 1998.
- [62] E. H. Herman and V. J. Ferrans, "Reduction of chronic doxorubicin cardiotoxicity in dogs by pretreatment with ($\pm$)-1, 2-bis (3, 5-dioxopiperazinyl-1-yl) propane (ICRF-187)," *Cancer research*, vol. 41(9 Part 1), pp. 3436-3440, 1981.
- [63] W. Morrison, "Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management," Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.
- [64] K. Ylanen, T. Poutanen, P. Savikurki-Heikkila, I. Rinta-Kiikka, A. Eerola, and K. Vettenranta, "Cardiac magnetic resonance imaging in the evaluation of the late effects of anthracyclines among long-term survivors of childhood cancer," *J Am Coll Cardiol*, vol. 61, pp. 1539-47, Apr 9 2013.
- [65] E. Fuchs, M. F. Muller, H. Oswald, H. Thony, P. Mohacsi, and O. M. Hess, "Cardiac rotation and relaxation in patients with chronic heart failure," *Eur J Heart Fail*, vol. 6, pp. 715-22, Oct 2004.
- [66] D. R. Trumble, W. E. McGregor, R. C. Kerckhoffs, and L. K. Waldman, "Cardiac assist with a twist: apical torsion as a means to improve failing heart function," *J Biomech Eng*, vol. 133, p. 101003, Oct 2011.
- [67] E. B. Tham, M. J. Haykowsky, K. Chow, M. Spavor, S. Kaneko, N. S. Khoo, et al., "Diffuse myocardial fibrosis by T1-mapping in children with subclinical anthracycline cardiotoxicity: relationship to exercise capacity, cumulative dose and remodeling," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 15, p. 48, 2013.

- [68] F. Bonner, N. Janzarik, C. Jacoby, M. Spieker, B. Schnackenburg, F. Range, et al., "Myocardial T2 mapping reveals age- and sex-related differences in volunteers," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 17, p. 9, 2015.

2.2.9 List of Figures

Figure 2.1: Injection and acquisition protocol. IT: Initial Time of the study (after animal acclimation), FT: Final Time (day of euthanasia).

Figure 2.2: Myocardial contours segmentation in our customized Matlab program. Curve 1: pericardium, curve 2: right ventricle, curve 3: left ventricle

Figure 2.3: Echocardiographic results including left ventricular ejection fraction (%), aortic flow velocity, left ventricle diameter in diastole, right ventricle diameter in diastole, pulmonary flow velocity, myocardial performance index, E/E' lateral wall (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the lateral wall of the left ventricle), and E/E' septum (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the interventricular septum).

Figure 2.4: Left and right ventricle areas (mm²) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.

Figure 2.5: Septum, left ventricle and right ventricle thicknesses (mm) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.

Figure 2.6: Normalized torsion (°) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at phase 1 and beginning of diastole (end-systole) around phase 17.

Figure 2.7: Left and right ventricle cumulative displacements (mm) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.

Figure 2.8: Mean cumulative strain values in systole (top) and in diastole (bottom) from one miniature swine at each acquisition time (A1, A2, A3).

Figure 2.9: Mean stress values during systole (top) and diastole (bottom) with 4 segments for the left ventricle (LV), 2 segments for the septum (SE) and 1 segment for the right ventricle (RV).

Figure 2.10: Mean T1 pre-gadolinium (ms), T1 post-gadolinium (ms) and T2 (ms) for the left ventricle of the doxorubicin group on the left and the control group on the right.

Figure 2.22: Injection and acquisition protocol. IT: Initial Time of the study (after animal acclimation), FT: Final Time (day of euthanasia).

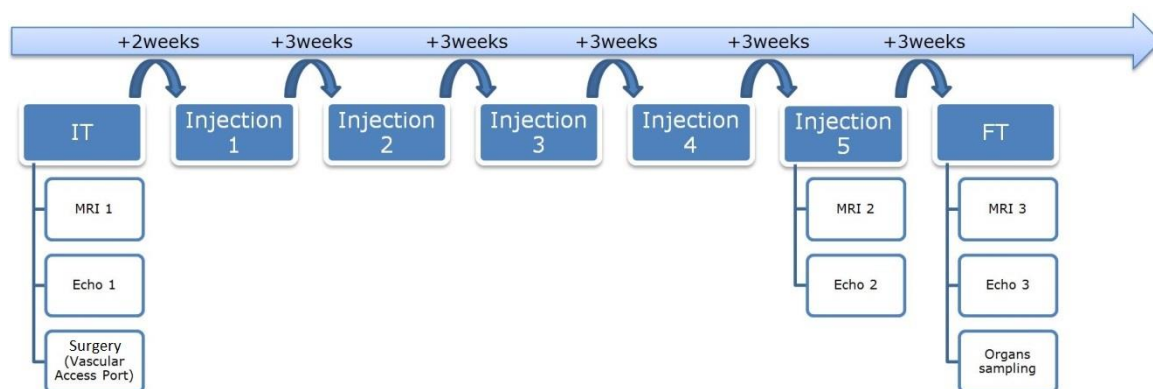


Figure 2.23: Myocardial contours segmentation in our customized Matlab program. Curve 1: pericardium, curve 2: right ventricle, curve 3: left ventricle

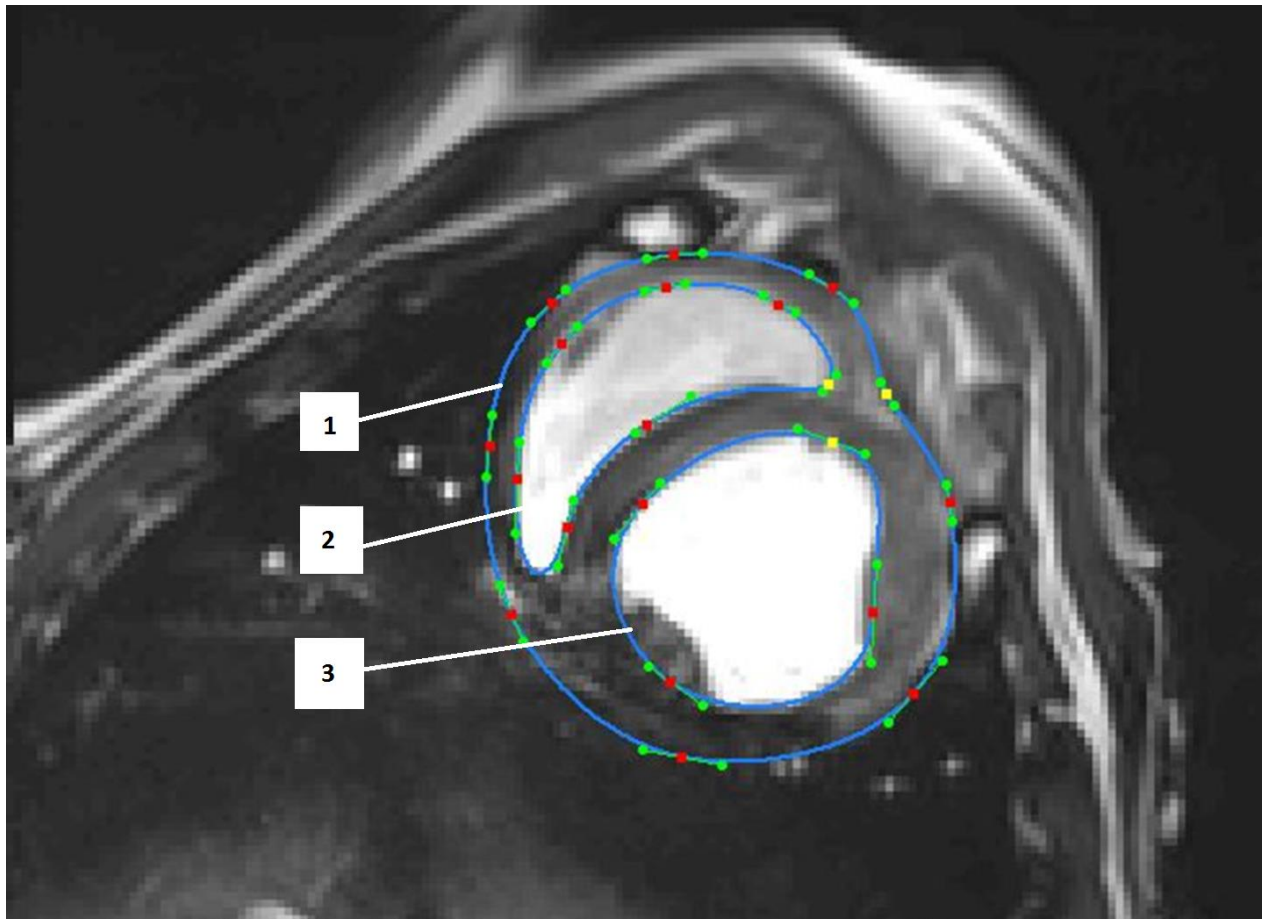
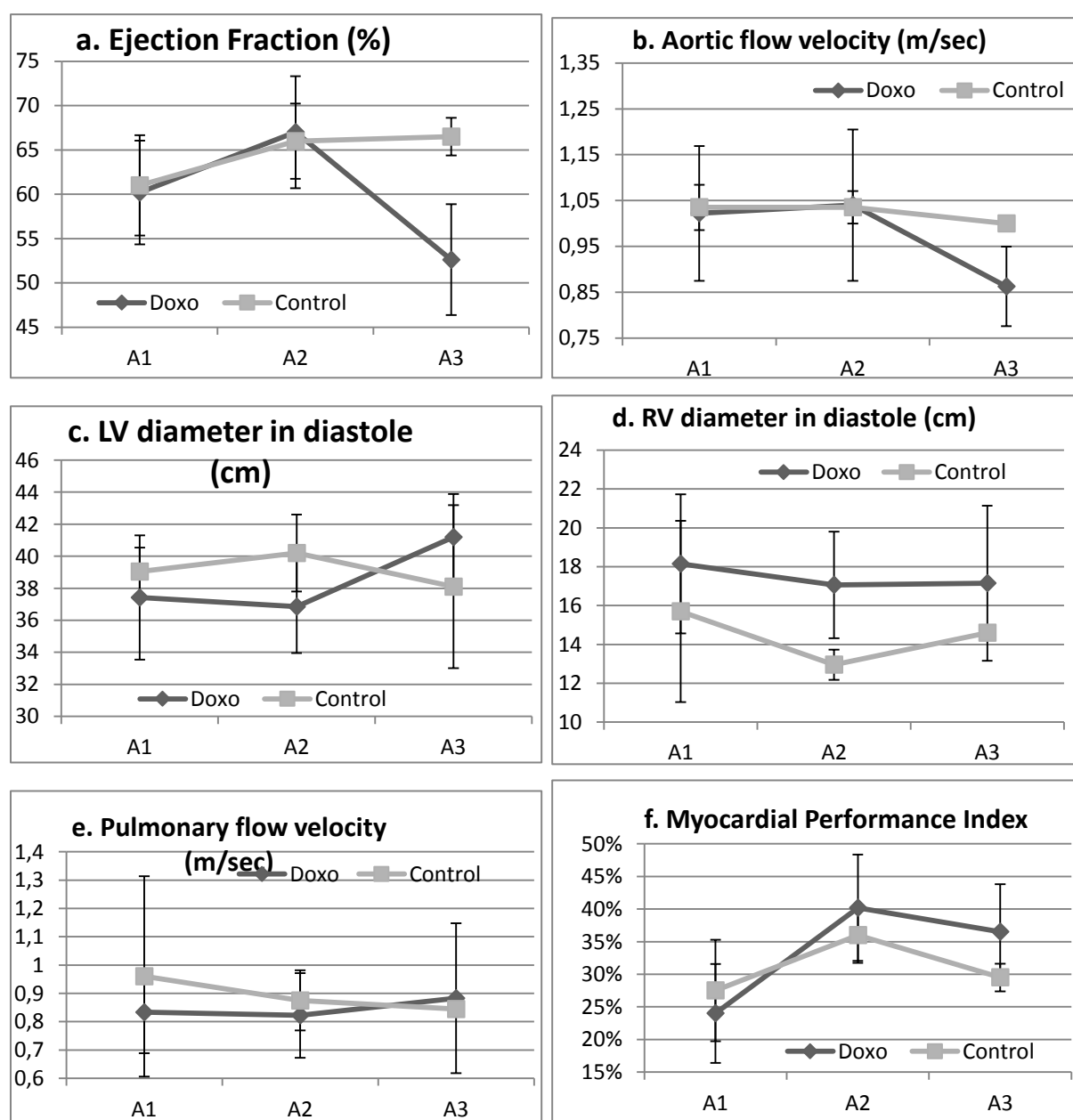


Figure 24: Echocardiographic results including left ventricular ejection fraction (a), aortic flow velocity (b), left ventricle diameter in diastole (c), right ventricle diameter in diastole (d), pulmonary flow velocity €, myocardial performance index (f), E/E' lateral wall (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the lateral wall of the left ventricle) (g), and E/E' septum (mitral E wave peak velocity / tissue Doppler E' velocity recorded at the level of the interventricular septum) (h).



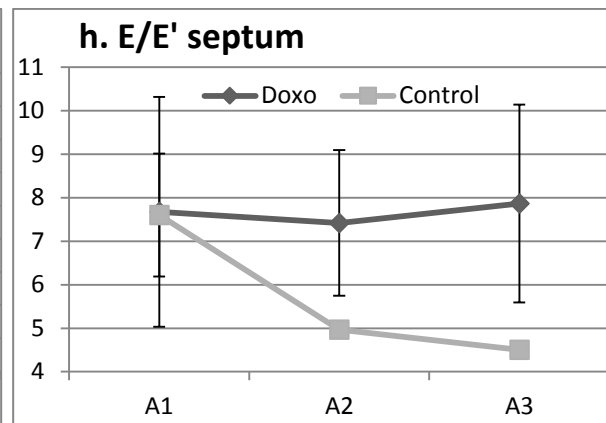
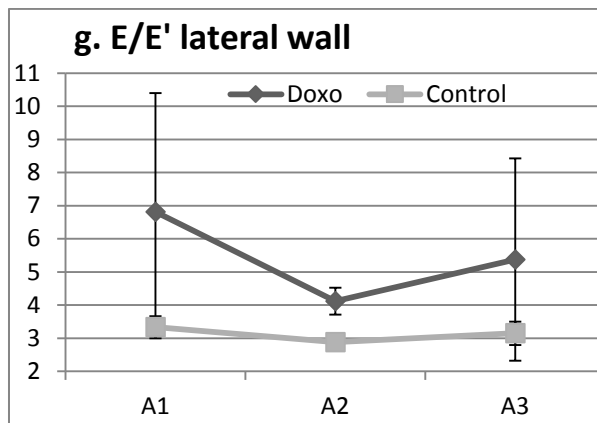


Figure 25: Left and right ventricle areas (mm^2) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.

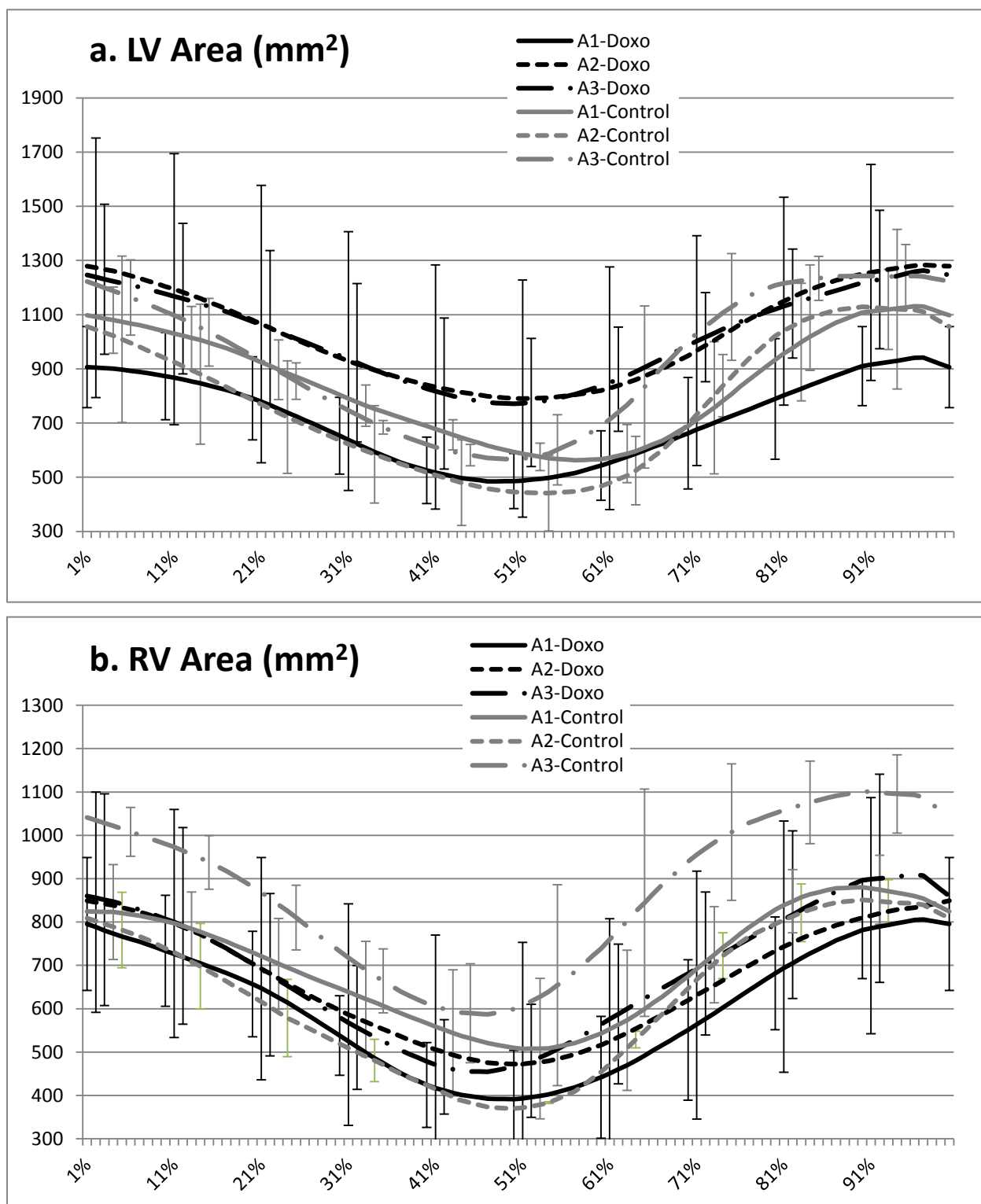


Figure 26: Septum, left ventricle and right ventricle thicknesses (mm) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.

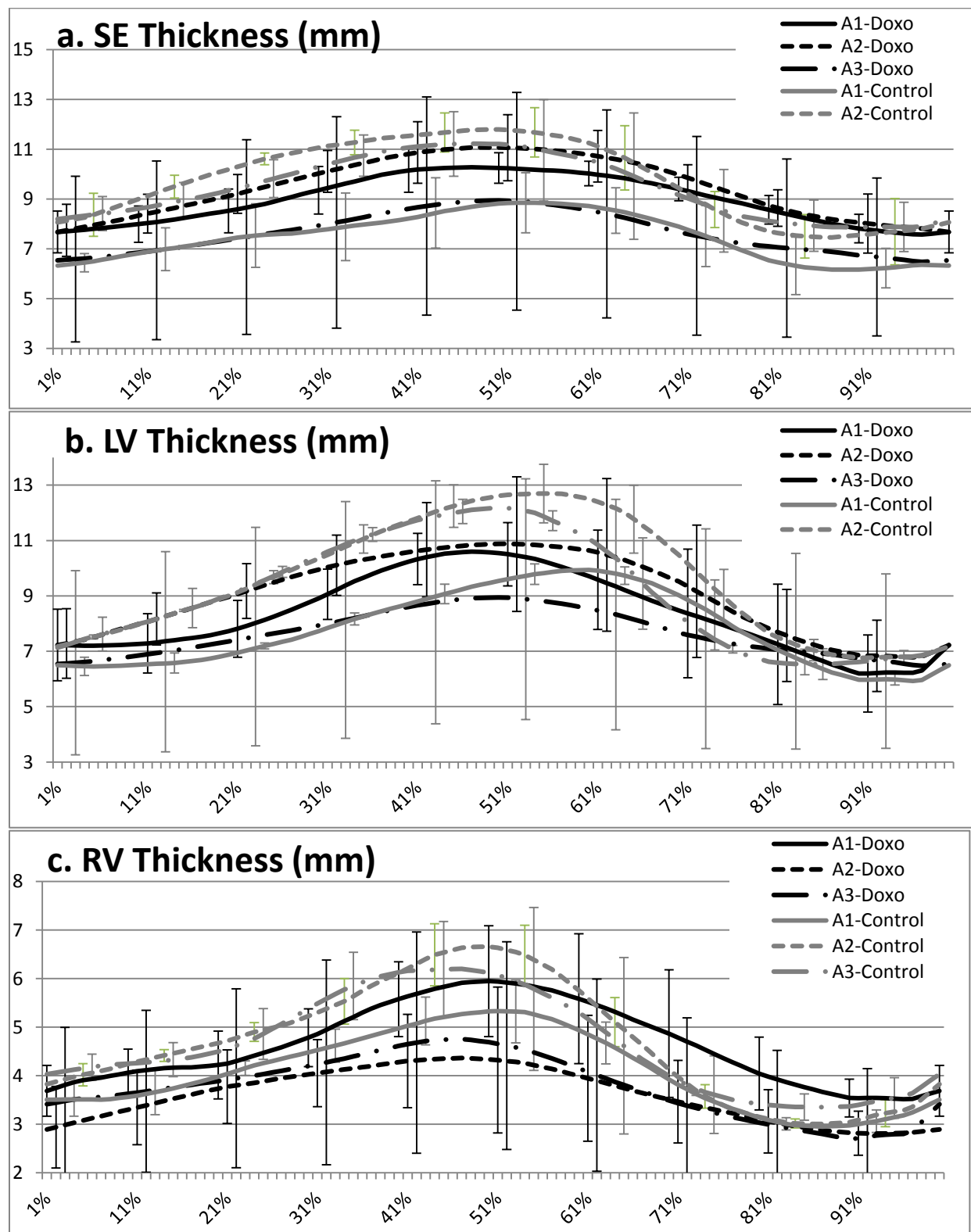


Figure 27: Normalized torsion ($^{\circ}$) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at phase 1 and beginning of diastole (end-systole) around phase 17.

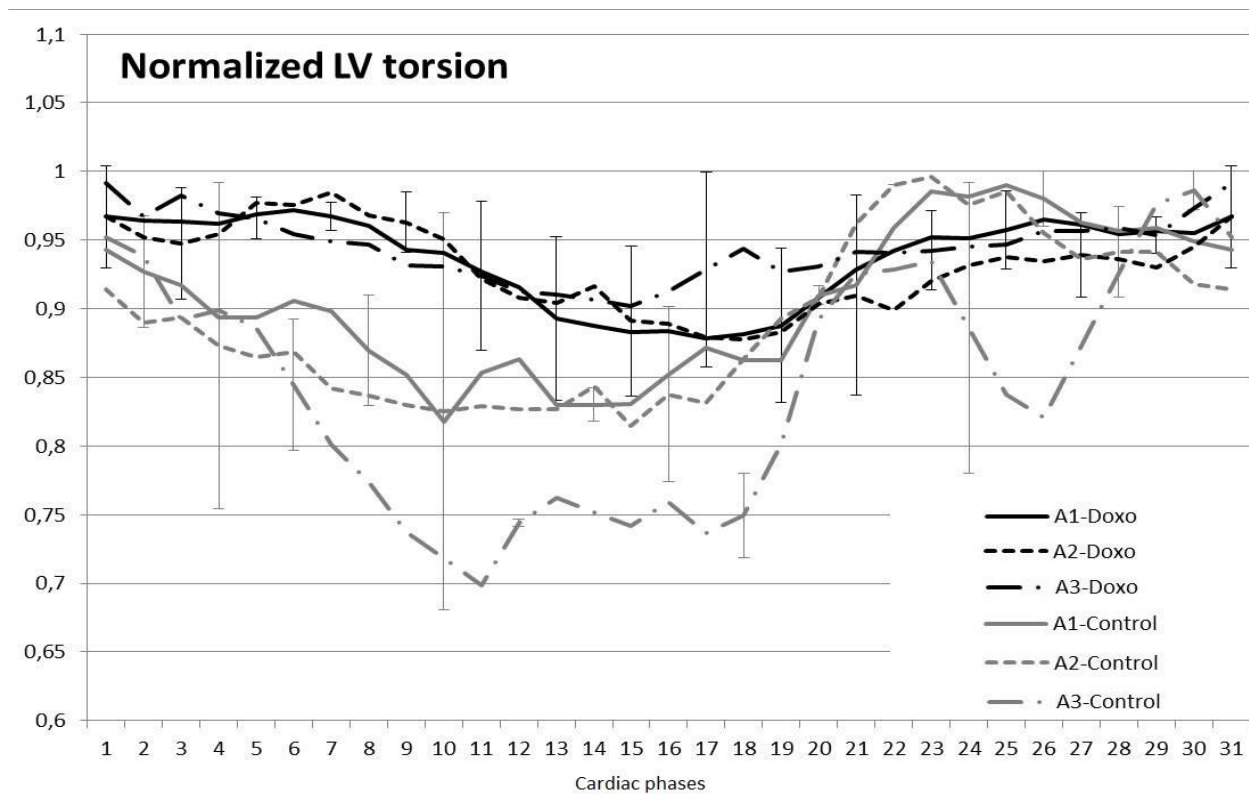


Figure 28: Left and right ventricle cumulative displacements (mm) along the cardiac cycle: beginning of systole (end-diastole) at 1% and beginning of diastole (end-systole) around 50%.

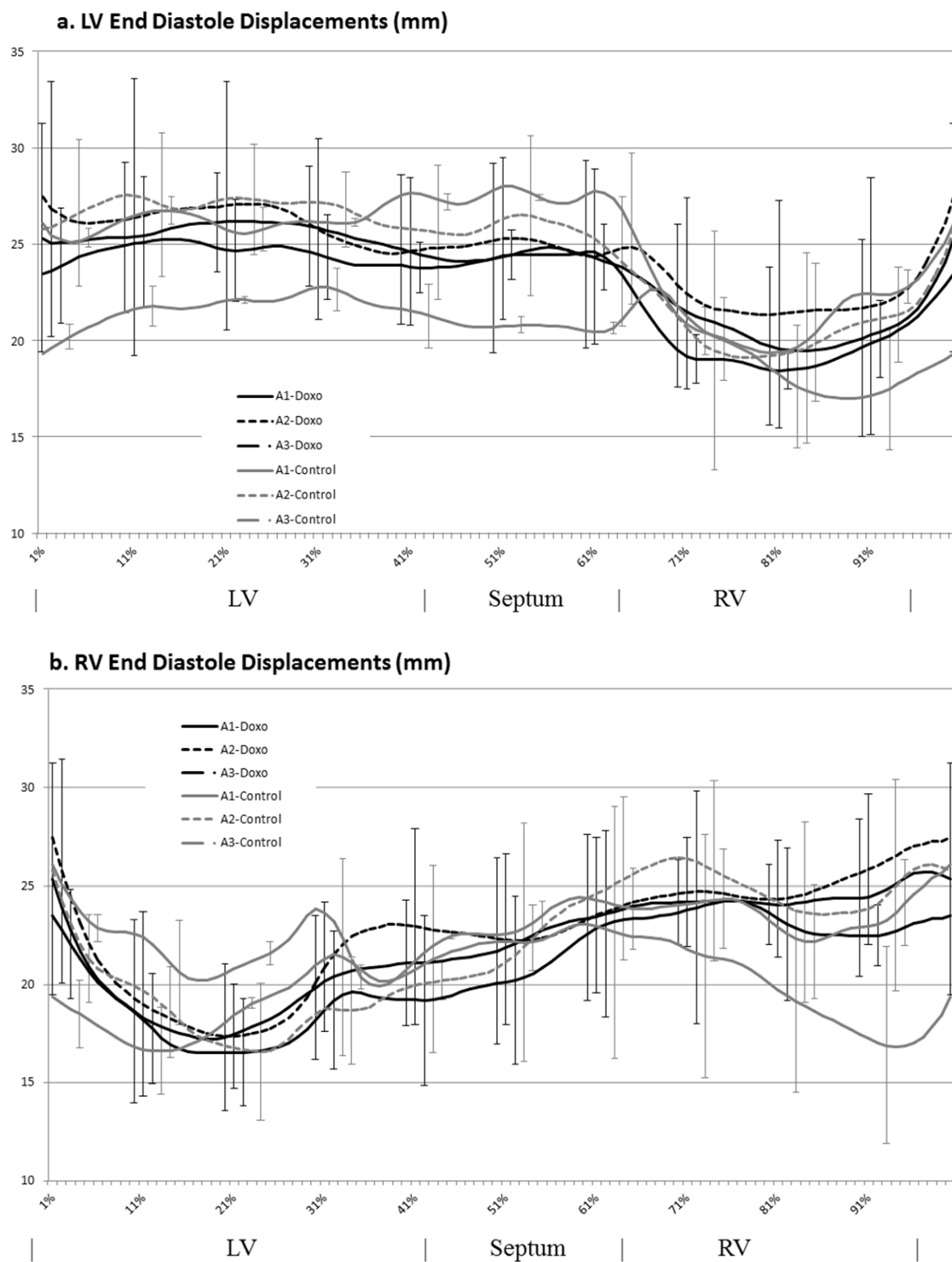


Figure 29: Mean cumulative strain values in systole (top) and in diastole (bottom) from one miniature swine at each acquisition time (A1, A2, A3).

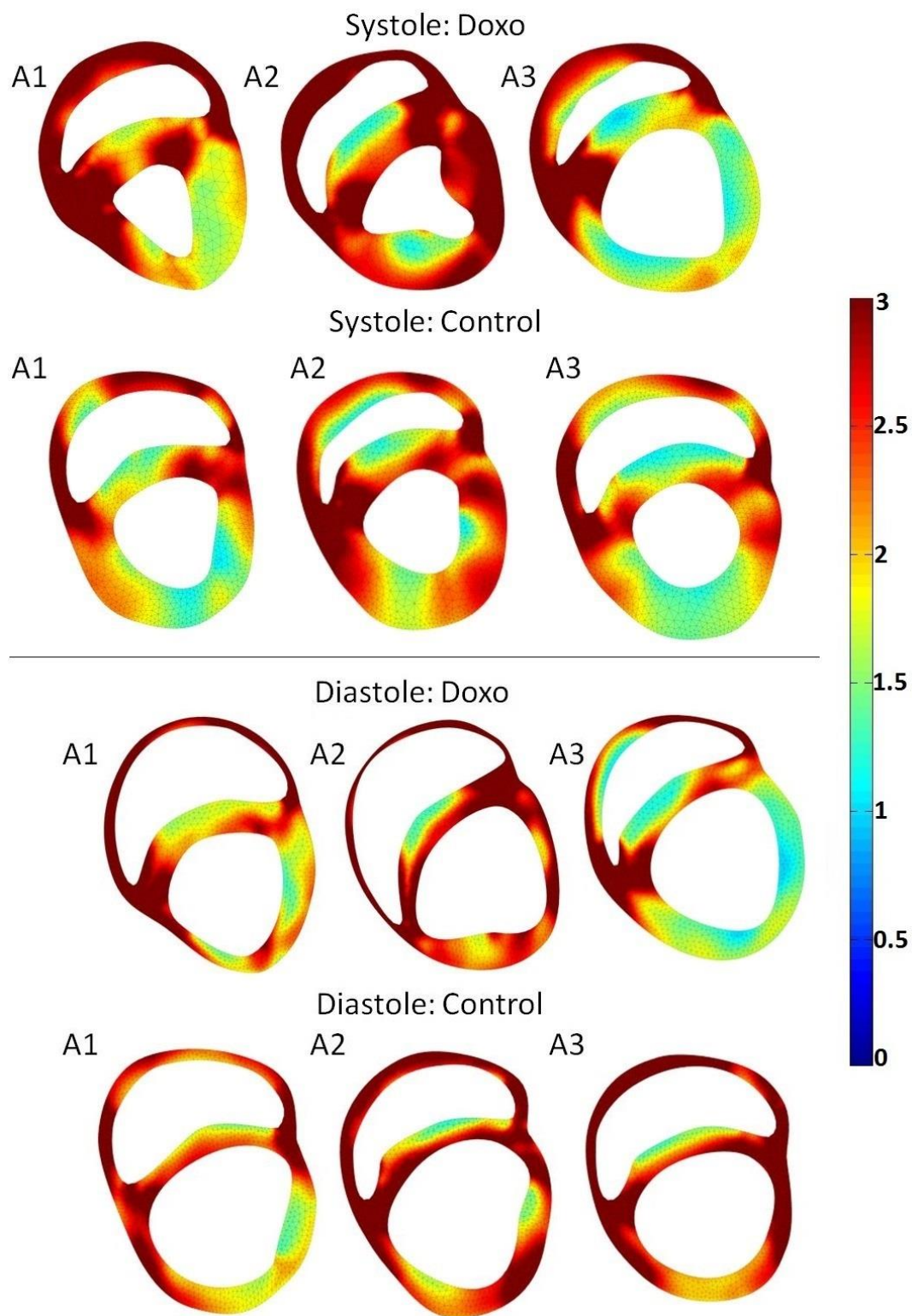


Figure 30: Mean stress values during systole (top) and diastole (bottom) with 4 segments for the left ventricle (LV), 2 segments for the septum (SE) and 1 segment for the right ventricle (RV).

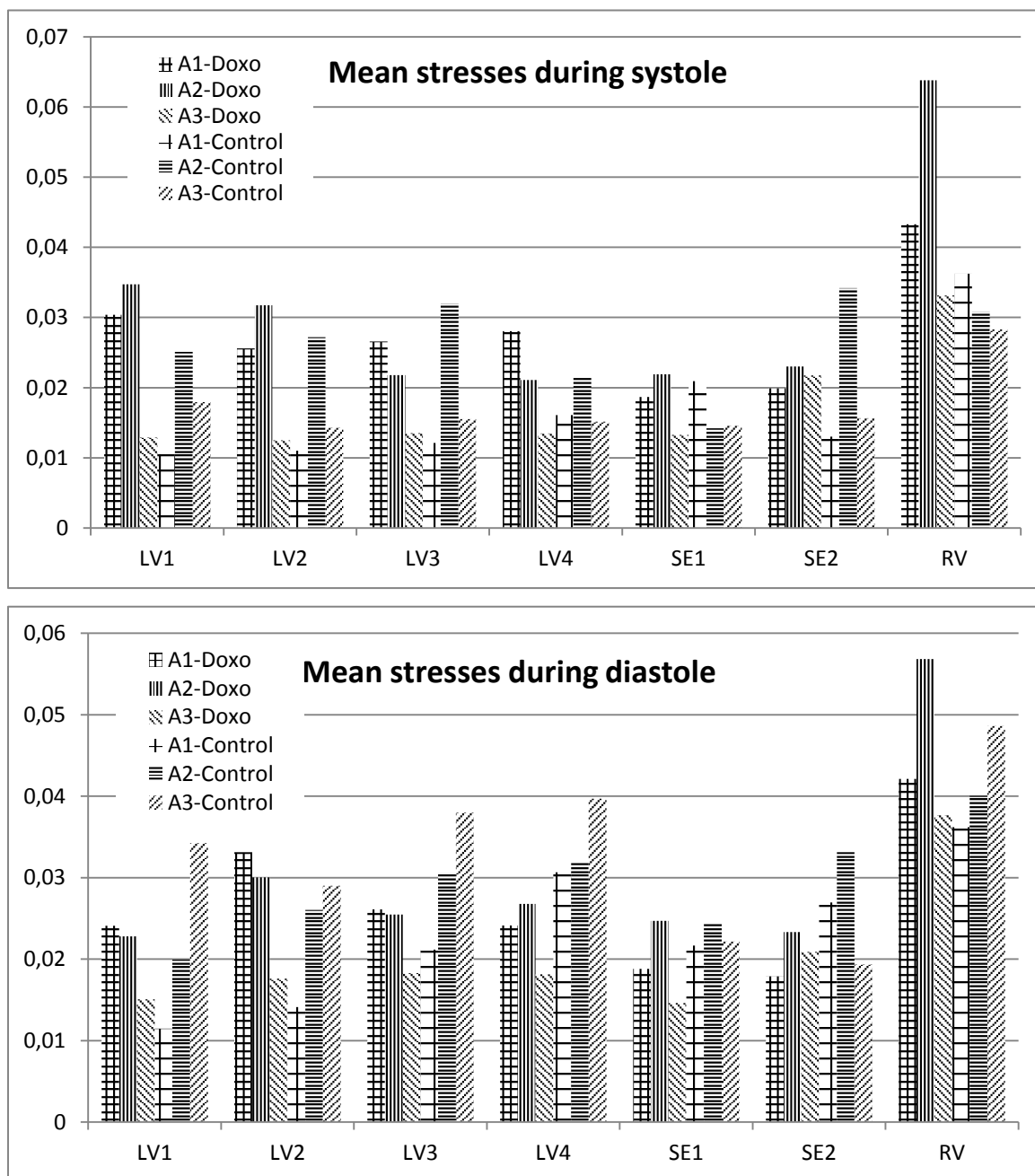
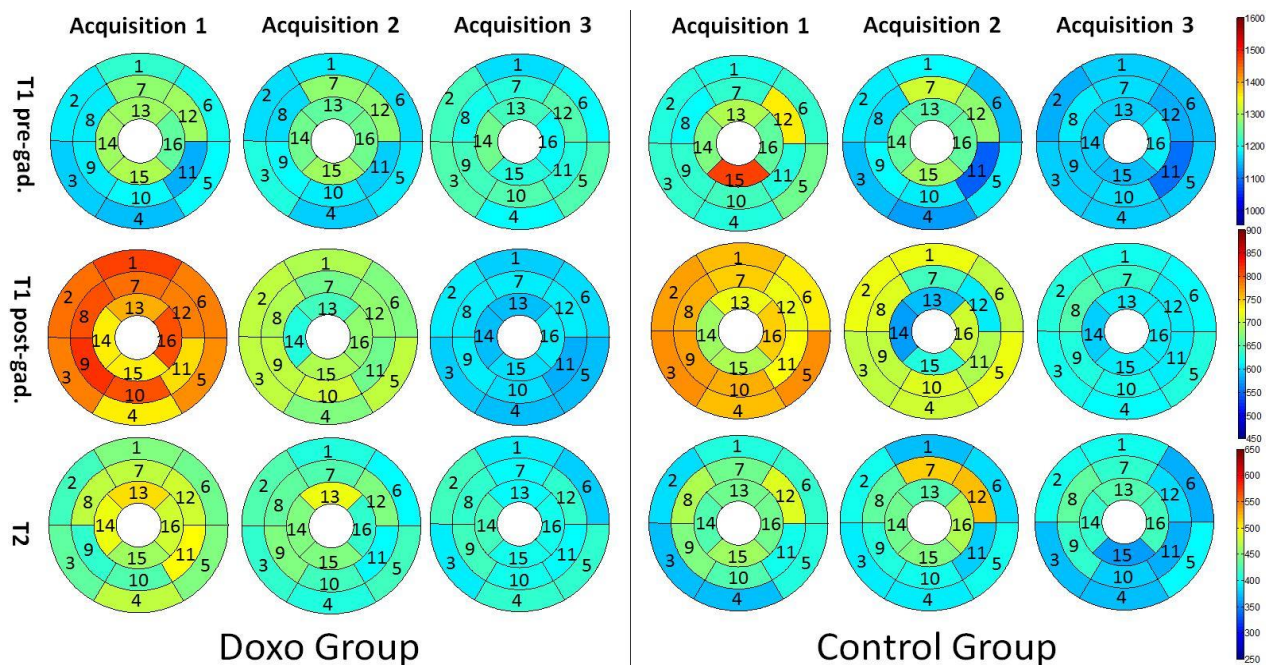


Figure 31: Mean T1 pre-gadolinium (ms), T1 post-gadolinium (ms) and T2 (ms) for the left ventricle of the doxorubicin group on the left and the control group on the right.



CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'étude présentée dans ce mémoire montre qu'en simulant le protocole clinique de chimiothérapie chez le miniporc, le développement d'une insuffisance cardiaque est observé. L'analyse des paramètres générés par IRM lors d'une chimiothérapie appliquée au miniporc montre le potentiel de cette méthode à détecter précocement les changements structuraux apparaissant dans le cœur lors d'un tel traitement.

Plusieurs protocoles réalisés sur le miniporc ne reproduisaient pas l'exposition chronique du médicament comme effectuée chez l'humain. Le protocole clinique propose une injection toutes les 3 semaines afin de rétablir le taux de plaquettes qui diminue sous l'action de la doxorubicine, c'est donc le protocole que nous avons choisi.

Les symptômes observés chez l'humain et dans les modèles antérieurs ont été vérifiés chez nos animaux, ainsi que le gain de poids ralenti chez les miniporcs malades. Nos données échocardiographiques montrent des fonctions d'éjection et de raccourcissement réduites dans le groupe Doxo, comme observé dans la littérature.

La constante croissance des épaisseurs et des déplacements myocardiques observée chez les miniporcs contrôles mais pas dans le groupe Doxo, ainsi que la réduction des aires et longueurs ventriculaires chez les miniporcs malades mais pas dans le groupe sain, suggèrent que ces paramètres tirés des images IRM sont de bons indicateurs de la santé du cœur détérioré par la doxorubicine. La réduction des contraintes et déformations chez les animaux du groupe Doxo suggère une fonction contractile réduite comme observée chez les survivants de cancer. La légère réduction de T1pre, associée à une déposition de lipides dans le cœur, observée chez nos miniporcs sains peut refléter leur gain de poids. La réduction de T1post observée dans le groupe Doxo pourrait représenter une fibrose due à la doxorubicine. Cependant, une légère réduction est également observée dans le groupe contrôle, probablement due à l'injection de saline qui aurait aussi des effets cardiaques néfastes [91]. La légère réduction de T2, associée à une augmentation du contenu en collagène, observée dans le groupe Doxo, pourrait refléter un tissu plus rigide, caractéristique des cardiomyopathies.

La réalisation des expérimentations a été conditionnelle à plusieurs facteurs : choix de l'IRM et de l'animalerie, choix des intervenants, choix de la compagnie d'élevage, rédaction des documents officiels, estimation des coûts, coordination des emplois du temps.

Le choix de l'animalerie a été restreint par la tarification élevée des compagnies privées et l'incapacité de certains centres de recherche hospitaliers à accueillir de grands animaux pour une durée étendue. Le centre de recherche du nouveau CR-CHUM avait l'avantage d'être adapté, disponible et de posséder un IRM de recherche qui a permis d'éviter un surcoût en frais de transport ainsi qu'un stress supplémentaire imposé aux animaux. Une étude pilote sur trois animaux a été demandée par le CIPA (Comité Institutionnel de Protection des Animaux) étalant l'étude animale sur deux fois cinq mois.

En conformité avec la littérature, nous avons travaillé avec le miniporc. D'après nos recherches, une seule compagnie canadienne propose la vente de miniporcs à destination de la recherche. Cependant, leur tarification élevée ainsi que l'impossibilité d'obtenir des miniporcs de l'âge souhaité limitait le choix de cette entreprise. Sinclair Bio Resources, basée aux Etats-Unis, était un choix plus avantageux en termes de concordance avec le protocole et le budget. L'inconvénient majeur d'une compagnie basée à l'étranger a concerné le caractère chronophage des formalités d'immigration, incluant des visites répétées d'un membre de l'ACIA (Agence Canadienne d'inspection des aliments) pour l'approbation du lieu des expérimentations. De plus, Sinclair a rencontré des problèmes de communication interne touchant la rapidité d'exécution des démarches administratives. Enfin, la coordination a été très délicate à cause des disponibilités restreintes de Sinclair et de l'IRM de l'animalerie du CR-CHUM mais l'âge des animaux à leur arrivée a finalement été bien contrôlé.

Le fait de réaliser une quarantaine sur les animaux achetés à l'étranger a permis à l'équipe de recherche plus de libertés sur les déplacements futurs des porcs, de leur sang et de leurs organes suite à l'euthanasie. Cependant cela augmente la durée de l'étude ainsi que son coût. De plus, mettre des porcs en quarantaine dans un établissement du Québec implique de n'avoir aucune autre étude sur des porcs pendant toute la durée de la quarantaine. C'est une loi qui peut facilement contraindre à éliminer l'option de la quarantaine. L'autre possibilité était de garder les animaux sous protocole de recherche, limitant les coûts d'hébergement mais impliquant une restriction des transferts des animaux vers l'extérieur de l'animalerie mais également en son sein.

En vue d'obtenir l'approbation indispensable du comité d'éthique du CR-CHUM, un dossier d'éthique animale a été rédigé. Celui-ci détaille le protocole et contient en particulier une liste de toutes les procédures utilisées sur les animaux, à la fois pour l'obtention des résultats mais aussi en ce qui concerne le bien-être des animaux. Ce même document décrit le protocole à

enclencher en cas d'urgence permettant de prévoir et d'anticiper les problèmes pouvant survenir. Ce document permet de se conscientiser sur la raison de l'utilisation d'animaux selon la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement, voir la définition complète en Annexe), d'apprendre à vulgariser le contexte de recherche avec l'appui d'articles prouvant la faisabilité du projet et de prévoir les résultats attendus. Il permet aussi d'identifier clairement les acteurs du projet et leurs tâches tout au long de l'étude grâce à un calendrier complet réalisé en collaborant avec les différentes équipes. Dans notre cas, un questionnaire complémentaire sur l'utilisation de matériel à biorisque a également dû être rempli étant donné que nous devions utiliser une anthracycline qui est un médicament cytotoxique, permettant de conscientiser l'équipe sur les risques d'utilisation d'un tel produit.

Le budget préliminaire s'est fait en collaboration avec l'équipe du CR-CHUM. Cependant, la différence entre l'estimation du budget et les coûts réels s'est avérée importante, si bien que nous aurions pu inclure un à deux porcs supplémentaires à l'étude. Ce manque d'optimisation des calculs est une limite importante du projet, car l'évaluation du nombre d'heures passées avec les animaux malades et la prédiction des coûts associés aux imprévus est délicate.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour la première fois, l'IRM ciné et l'IRM multiparamétrique ont été utilisées conjointement pour caractériser le comportement mécanique du cœur. Le protocole utilisé et les outils d'analyse développés au sein de notre équipe ont permis de déceler l'apparition précoce des légères modifications des propriétés du muscle cardiaque avant la détection faite par échocardiographie. La détection précoce de ces changements est nécessaire aux oncologistes afin de prédire la progression de la pathologie et personnaliser le traitement. Pour faire suite à cette étude, des projets à plus long terme devraient voir le jour afin d'étudier les effets retardés chroniques de la doxorubicine. Pour cela, le protocole pourrait être optimisé en ajoutant des acquisitions IRM, permettant de suivre plus précisément l'évolution des paramètres calculés, et en répartissant la dose totale cumulative sur plus d'injections (par exemple 7 doses de 50mg/m²)

Après l'euthanasie des animaux, des échantillons ont été prélevés dans le cœur, le foie, les reins, la carotide et l'aorte abdominale, les muscles squelettiques de la cuisse, et le diaphragme, et conservés dans l'azote liquide à -80°C pour certains et dans la formaline pour d'autres afin de compléter par la suite des analyses de différentes natures dans de futurs projets. Un prélèvement d'échantillons de muscle squelettique des pattes arrières de nos miniporcs a été réalisé par l'équipe du Pr. Coustillou de l'UQAM pour l'étude de la fonction mitochondriale, c'est-à-dire l'étude du fonctionnement des différents complexes de la chaîne de transport des électrons, ou en d'autres mots l'étude du comportement physiologique des mitochondries. Ce type d'analyse est particulièrement intéressant pour l'étude de la pathophysiologie de certaines maladies comme les myopathies. Des analyses biochimiques sont prévues au sein du laboratoire LCM-Services de Spectroscopie Infrarouge de l'Université de Montréal sur des échantillons cardiaques. Des analyses utilisant la technique FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometry) seraient intéressantes à réaliser. En effet cette méthode permet d'obtenir un spectre représentant l'absorption et la transmission moléculaire d'un échantillon donné. Une structure moléculaire a un spectre infrarouge unique, cette technique se révèle donc utile pour différents types d'analyses comme pour identifier un nouveau matériel, déterminer la composition d'un échantillon à la fois en termes de qualité et de quantité de structures.

Enfin, certains échantillons du cœur ont été découpés assez gros en vue de leur analyse par élastographie par résonance magnétique à l'Université de Sherbrooke afin de mieux

comprendre la réaction mécanique du tissu cardiaque lorsqu'un patient est soumis à une chimiothérapie.

Sur le long terme, une telle compréhension est nécessaire afin de proposer le développement de traitements précoces, plus efficaces et moins invasifs, voire préventifs, en les administrant avant qu'apparaisse un stage avancé de la dégénérescence.

L'automatisation de nos outils a un potentiel commercial auprès des compagnies en imagerie médicale puisque la technique pourrait intéresser tous les cardiologues traitant ces maladies tant en pédiatrie que chez l'adulte.

Les connaissances résultant de notre étude ont donc des conséquences directes sur la qualité des soins prodigués aux patients souffrant de cancer, sur la rationalisation des coûts de santé, mais aussi sur la survie et la qualité de vie future de ces patients.

RÉFÉRENCES

- [1] C. E. Murry and W. T. Pu, "Reprogramming Fibroblasts into Cardiomyocytes," *The New England journal of medicine*, vol. 364, pp. 177-178, 2011.
- [2] P. Lacolley, D. Babuty, C. Boulanger, B. Ghaleh, G. Loirand, F. Pinet, *et al.*, "Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux," 2008.
- [3] G. M. Fomovsky, S. Thomopoulos, and J. W. Holmes, "Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 48, pp. 490-496, 3// 2010.
- [4] V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, *et al.*, "Heart Disease and Stroke Statistics—2011 Update: A Report From the American Heart Association," *Circulation*, vol. 123, pp. e18-e209, February 1, 2011.
- [5] N. Ayache, H. Delingette, and M. Sermesant, "Le coeur numérique personnalisé," *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, vol. 195, 2011.
- [6] J. M. O. Arnold, P. Liu, C. Demers, P. Dorian, N. Giannetti, H. Haddad, *et al.*, "Canadian Cardiovascular Society consensus conference recommendations on heart failure 2006: Diagnosis and management," *Canadian Journal of Cardiology*, vol. 22, pp. 23-45, 1// 2006.
- [7] M. Ron Goeree, "Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society position paper on implantable cardioverter defibrillator use in Canada," *Can J Cardiol*, vol. 21, p. 11A, 2005.
- [8] W. H. Gaasch, "Diagnosis and treatment of heart failure based on left ventricular systolic or diastolic dysfunction," *Jama*, vol. 271, pp. 1276-1280, 1994.
- [9] P. Clarkson, N. Wheeldon, and T. Macdonald, "Left ventricular diastolic dysfunction," *The Quarterly journal of medicine*, vol. 87, pp. 143-148, 1994.
- [10] J. P. Gélière, P. Valat, P. Gosse, Y. Kabbani, and G. Janvier, "Fonction diastolique ventriculaire gauche: physiologie, physiopathologie, évaluation, moyens thérapeutiques, incidences en anesthésie," *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, vol. 17, pp. 319-339, // 1998.
- [11] G. Bellon and S. Chevallier, "Élastokines : facteurs de survie cardiaque," *Médecine & Longévité*, vol. 1, pp. 94-101, 12// 2009.
- [12] J. D. Humphrey and F. C. P. Yin, "On Constitutive Relations and Finite Deformations of Passive Cardiac Tissue: I. A Pseudostrain-Energy Function," *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 109, pp. 298-304, 1987.
- [13] I. Borazjani, "Fluid–structure interaction, immersed boundary-finite element method simulations of bio-prosthetic heart valves," *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, vol. 257, pp. 103-116, 2013.
- [14] E. Votta, T. B. Le, M. Stevanella, L. Fusini, E. G. Caiani, A. Redaelli, *et al.*, "Toward patient-specific simulations of cardiac valves: state-of-the-art and future directions," *Journal of biomechanics*, vol. 46, pp. 217-228, 2013.

- [15] O. Zettinig, T. Mansi, B. Georgescu, S. Rapaka, A. Kamen, J. Haas, *et al.*, "From medical images to fast computational models of heart electromechanics: an integrated framework towards clinical use," in *Functional Imaging and Modeling of the Heart*, ed: Springer, 2013, pp. 249-258.
- [16] M. S. Vieira, T. Hussain, and C. A. Figueroa, "Patient-Specific Image-Based Computational Modeling in Congenital Heart Disease: A Clinician Perspective," *Journal of Cardiology and Therapy*, vol. 2, pp. 436-448, 2015.
- [17] C. F. Aissiou M., Curnier D., Hafyane T., Friedrich M., Laverdière C., Andelfinger G, Krajcinovic M., Sinett D., Périé D., "Myocardial 2D strain and stress indices in the detection of cardiotoxicity in cancer survivors," *Journal of Biomechanics*, to be submitted.
- [18] J. W. Hurst, "Naming of the Waves in the ECG, With a Brief Account of Their Genesis," *Circulation*, vol. 98, pp. 1937-1942, 1998.
- [19] M. Lotrionte, G. Palazzoni, R. Natali, G. Commerci, A. Abbate, F. Loperfido, *et al.*, "Assessment of left ventricular systolic dysfunction by tissue Doppler imaging to detect subclinical cardiomyopathy early after anthracycline therapy," *Minerva cardioangiologica*, vol. 55, pp. 711-720, 2007/12// 2007.
- [20] Y. Kang, L. Cheng, L. Li, H. Chen, M. Sun, Z. Wei, *et al.*, "Early detection of anthracycline-induced cardiotoxicity using two-dimensional speckle tracking echocardiography," *Cardiol J*, vol. 20, pp. 592-9, 2013.
- [21] R. B. Devereux and N. Reichek, "Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method," *Circulation*, vol. 55, pp. 613-618, 1977.
- [22] S. D. Solomon, "Echocardiographic Instrumentation and Principles of Doppler Echocardiography," in *Essential Echocardiography. A practical handbook with DVD*, M. Christopher P. CANNON, Ed., ed: Humana Press, 2007, pp. 3-19.
- [23] Singh, Siddharth, and A. Goyal, "Tribute to Inge Edler - The Origin of Echocardiography," *Texas Heart Institute Journal*, 2007.
- [24] P. Thavendiranathan, F. Poulin, K. D. Lim, J. C. Plana, A. Woo, and T. H. Marwick, "Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: a systematic review," *J Am Coll Cardiol*, vol. 63, pp. 2751-68, Jul 1 2014.
- [25] D. Lee and S. D. Solomon, "Introduction to Imaging: The Normal Examination," in *Essential Echocardiography. A practical handbook with DVD*, M. Christopher P. CANNON, Ed., ed: Humana Press, 2007, pp. 19-35.
- [26] F. Mettler, D. Young, and J. Ward, "Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats," *Cancer Research*, vol. 37, pp. 2705-2713, 1977.
- [27] J. H. Schellens, H. L. McLeod, and D. R. Newell, *Cancer clinical pharmacology*: Oxford University Press, 2005.
- [28] D. Gewirtz, "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin," *Biochemical Pharmacology*, vol. 57, pp. 727-741, 4/1/ 1999.

- [29] M. Ryberg, D. Nielsen, G. Cortese, G. Nielsen, T. Skovsgaard, and P. K. Andersen, "New Insight Into Epirubicin Cardiac Toxicity: Competing Risks Analysis of 1097 Breast Cancer Patients," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 100, pp. 1058-1067, August 6, 2008.
- [30] T. M. Kadia, F. Ravandi, J. Cortes, and H. Kantarjian, "Toward individualized therapy in acute myeloid leukemia: A contemporary review," *JAMA Oncology*, vol. 1, pp. 820-828, 2015.
- [31] K. Shan, A. M. Lincoff, and J. B. Young, "Anthracycline-Induced Cardiotoxicity," *Annals of Internal Medicine*, vol. 125, pp. 47-58, 1996.
- [32] M. Lotrionte, G. Biondi-Zoccai, A. Abbate, G. Lanzetta, F. D'Ascenzo, V. Malavasi, *et al.*, "Review and meta-analysis of incidence and clinical predictors of anthracycline cardiotoxicity," *Am J Cardiol*, vol. 112, pp. 1980-4, Dec 15 2013.
- [33] A. Conway, A. L. McCarthy, P. Lawrence, and R. A. Clark, "The prevention, detection and management of cancer treatment-induced cardiotoxicity: a meta-review," *BMC Cancer*, vol. 15, p. 366, 2015.
- [34] L. Seymour, V. Bramwell, and L. Moran, "Use of dexrazoxane as a cardioprotectant in patients receiving doxorubicin or epirubicin chemotherapy for the treatment of cancer. The Provincial Systemic Treatment Disease Site Group," *Cancer prevention & control: CPC= Prevention & controle en cancerologie: PCC*, vol. 3, pp. 145-159, 1999.
- [35] F. L. Meijler and T. D. Meijler, "Archetype, adaptation and the mammalian heart," *Netherlands Heart Journal*, vol. 19, pp. 142-148, 02/22 2011.
- [36] J. Serrano, C. M. Palmeira, D. W. Kuehl, and K. B. Wallace, "Cardioselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration1," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1411, pp. 201-205, 4/21/ 1999.
- [37] S. Zhou, C. M. Palmeira, and K. B. Wallace, "Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes," *Toxicology Letters*, vol. 121, pp. 151-157, 5/19/ 2001.
- [38] D. Lebrecht, B. Setzer, U.-P. Ketelsen, J. Haberstroh, and U. A. Walker, "Time-Dependent and Tissue-Specific Accumulation of mtDNA and Respiratory Chain Defects in Chronic Doxorubicin Cardiomyopathy," *Circulation*, vol. 108, pp. 2423-2429, November 11, 2003.
- [39] S. Yilmaz, A. Atessahin, E. Sahna, I. Karahan, and S. Ozer, "Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity," *Toxicology*, vol. 218, pp. 164-171, 2/1/ 2006.
- [40] A. L. A. Ferreira, D. M. F. Salvadori, M. C. M. O. Nascimento, N. S. Rocha, C. R. Correa, E. J. Pereira, *et al.*, "Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 631, pp. 26-35, 7/10/ 2007.
- [41] E. H. Herman and V. J. Ferrans, "Reduction of chronic doxorubicin cardiotoxicity in dogs by pretreatment with ($\pm$)-1, 2-bis (3, 5-dioxopiperazinyl-1-yl) propane (ICRF-187)," *Cancer research*, vol. 41(9 Part 1), pp. 3436-3440, 1981.

- [42] F. Köhn, "Chapter 1. History and Development of Miniature, Micro- and Minipigs," in *The Minipig in Biomedical Research*, C. Press, Ed., ed: Taylor & Francis Group, LLC, 2011-10-03.
- [43] G. Bode, P. Clausing, F. Gervais, J. Loegsted, J. Luft, V. Nogues, *et al.*, "The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology," *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 62, pp. 196-220, Nov-Dec 2010.
- [44] C. Bloor, F. White, and D. Roth, "The pig as a model of myocardial ischemia and gradual coronary artery occlusion," *Swine as models in biomedical research*, vol. 175, 1992.
- [45] Y. Kobari, M. Koto, and M. Tanigawa, "Regression of diet-induced atherosclerosis in Göttingen Miniature Swine," *Laboratory animals*, vol. 25, pp. 110-116, 1991.
- [46] K. H. Schuleri, A. J. Boyle, M. Centola, L. C. Amado, R. Evers, J. M. Zimmet, *et al.*, "The adult Göttingen minipig as a model for chronic heart failure after myocardial infarction: focus on cardiovascular imaging and regenerative therapies," *Comparative medicine*, vol. 58, p. 568, 2008.
- [47] L. Jacobsson, L. Lundholm, and G. Wingren, "Sudden Death Related to Advanced Coronary Atherosclerosis in Mini-Pigs: Influence of some Drugs," *Acta pharmacologica et toxicologica*, vol. 55, pp. 174-182, 1984.
- [48] M. M. Swindle, *Swine in the laboratory: surgery, anesthesia, imaging, and experimental techniques*: CRC Press, 2007.
- [49] E. H. Herman and V. J. Ferrans, "Influence of vitamin E and ICRF-187 on chronic doxorubicin cardiotoxicity in miniature swine," *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 49, pp. 69-77, 1983/07// 1983.
- [50] A. DA, V. N, V. MA, S. R, and B. DE, "An evaluation of hepatic extraction and clearance of doxorubicin," 1995.
- [51] I. R. Dubbelboer, E. Lilienberg, M. Hedeland, U. Bondesson, M. Piquette-Miller, E. Sjogren, *et al.*, "The effects of lipiodol and cyclosporine on the hepatobiliary disposition of doxorubicin in pigs," *Mol Pharm*, Feb 21 2014.
- [52] S. C. Cassidy, D. P. Chan, D. G. Rowland, and H. D. Allen, "Effects of Doxorubicin on Diastolic Function, Contractile Reserve, and Ventricular–Vascular Coupling in Piglets," 1998.
- [53] S. Christiansen, A. Perez-Bouza, G. Schälte, R.-D. Hilgers, and R. Autschbach, "Selective Left Ventricular Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in the Pig," 2007.
- [54] R. Damadian, "Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance," *Science*, vol. 171, pp. 1151-1153, 1971.
- [55] I. SAS. (2014, 2014-11-27). *L'IRM pas à pas : cours interactif sur l'imagerie par résonance magnétique*. Available: <http://www.imaio.com/fr/e-Cours/e-MRI/>
- [56] C. Tsallis, "Possible generalization of Boltzmann-Gibbs statistics," *Journal of Statistical Physics*, vol. 52, pp. 479-487, 1988/07/01 1988.
- [57] R. A. Pooley, "Fundamental Physics of MR Imaging," *RadioGraphics*, vol. 25, pp. 1087-1099, 2005.

- [58] W. A. Gibby, "Basic principles of magnetic resonance imaging," *Neurosurgery Clinics of North America*, vol. 16, pp. 1-64, 1// 2005.
- [59] R. Bitar, G. Leung, R. Perng, S. Tadros, A. R. Moody, J. Sarrazin, *et al.*, "MR Pulse Sequences: What Every Radiologist Wants to Know but Is Afraid to Ask," *RadioGraphics*, vol. 26, pp. 513-537, 2006.
- [60] J. R. Teruel, M. G. Heldahl, P. E. Goa, M. Pickles, S. Lundgren, T. F. Bathen, *et al.*, "Dynamic contrast-enhanced MRI texture analysis for pretreatment prediction of clinical and pathological response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer," *NMR in Biomedicine*, vol. 27, pp. 887-896, 2014.
- [61] T. Yokoo, T. Wolfson, K. Iwaisako, M. R. Peterson, H. Mani, Z. Goodman, *et al.*, "Evaluation of Liver Fibrosis Using Texture Analysis on Combined-Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Images at 3.0T," *BioMed Research International*, vol. 2015, p. 12, 2015.
- [62] B. Chaudhury, L. O. Hall, D. B. Goldgof, R. A. Gatenby, R. Gillies, and J. S. Drukteinis, "New method for predicting estrogen receptor status utilizing breast MRI texture kinetic analysis," 2014, pp. 90351V-90351V-6.
- [63] W. Feng, D. Utriainen, G. Trifan, S. Elias, S. Sethi, J. Hewett, *et al.*, "Characteristics of flow through the internal jugular veins at cervical C2/C3 and C5/C6 levels for multiple sclerosis patients using MR phase contrast imaging," *Neurological Research*, vol. 34, pp. 802-809, 2012.
- [64] B. Battal, M. Kocaoglu, N. Bulakbasi, G. Husmen, H. T. Sanal, and C. Tayfun, "Cerebrospinal fluid flow imaging by using phase-contrast MR technique," *The British Journal of Radiology*, vol. 84, pp. 758-765, 2011.
- [65] D. Perie, J. Iatridis, C. Demers, T. Goswami, G. Beaudoin, F. Mwale, *et al.*, "Assessment of compressive modulus, hydraulic permeability and matrix content of trypsin-treated nucleus pulposus using quantitative MRI," *Journal of biomechanics*, vol. 39, pp. 1392-1400, 2006.
- [66] J. P. Finn, K. Nael, V. Deshpande, O. Ratib, and G. Laub, "Cardiac MR Imaging: State of the Technology 1," *Radiology*, vol. 241, pp. 338-354, 2006.
- [67] M. Poustchi-Amin, F. R. Gutierrez, J. J. Brown, S. A. Mirowitz, V. R. Narra, N. Takahashi, *et al.*, "How to plan and perform a cardiac MR imaging examination," *Radiologic Clinics of North America*, vol. 42, pp. 497-514, 2004.
- [68] S. Pujadas, G. P. Reddy, O. Weber, J. J. Lee, and C. B. Higgins, "MR imaging assessment of cardiac function," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 19, pp. 789-799, 2004.
- [69] H.-J. Smith, "Clinical Cardiac MRI with Interactive CD-ROM," *Acta Radiologica*, vol. 47, 2006.
- [70] S. Giri, Y.-C. Chung, A. Merchant, G. Mihai, S. Rajagopalan, S. V. Raman, *et al.*, "T2 quantification for improved detection of myocardial edema," *Journal of cardiovascular magnetic resonance*, vol. 11, p. 56, 2009.
- [71] H. Abdel-Aty, P. Boyé, P. Bock, A. Kumar, and M. G. Friedrich, "Stenotic mitral valve prosthesis with left atrial thrombus," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 7, pp. 421-423, 2005.

- [72] H. Abdel-Aty, M. Cocker, C. Meek, J. V. Tyberg, and M. G. Friedrich, "Edema as a very early marker for acute myocardial ischemia: a cardiovascular magnetic resonance study," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 53, pp. 1194-1201, 2009.
- [73] H. Abdel-Aty, O. Simonetti, and M. G. Friedrich, "T2-weighted cardiovascular magnetic resonance imaging," *Journal of magnetic resonance imaging*, vol. 26, pp. 452-459, 2007.
- [74] A. E. Arai, "Using magnetic resonance imaging to characterize recent myocardial injury utility in acute coronary syndrome and other clinical scenarios," *Circulation*, vol. 118, pp. 795-796, 2008.
- [75] C. R. Butler, R. Thompson, M. Haykowsky, M. Toma, and I. Paterson, "Cardiovascular magnetic resonance in the diagnosis of acute heart transplant rejection: a review," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 11, p. 7, 2009.
- [76] M. Francone, C. Bucciarelli-Ducci, I. Carbone, E. Canali, R. Scardala, F. A. Calabrese, *et al.*, "Impact of primary coronary angioplasty delay on myocardial salvage, infarct size, and microvascular damage in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: insight from cardiovascular magnetic resonance," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 54, pp. 2145-2153, 2009.
- [77] P. Kellman, A. H. Aletras, C. Mancini, E. R. McVeigh, and A. E. Arai, "T2-prepared SSFP improves diagnostic confidence in edema imaging in acute myocardial infarction compared to turbo spin echo," *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 57, pp. 891-897, 2007.
- [78] G. A. Krombach, C. Hahn, M. Tomars, A. Buecker, A. Grawe, R. W. Günther, *et al.*, "Cardiac amyloidosis: MR imaging findings and T1 quantification, comparison with control subjects," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 25, pp. 1283-1287, 2007.
- [79] J. C. Moon, D. R. Messroghli, P. Kellman, S. K. Piechnik, M. D. Robson, M. Ugander, *et al.*, "Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: a Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR Working Group of the European Society of Cardiology consensus statement," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 15, p. 92, 2013.
- [80] L. Iles, H. Pfluger, A. Phrommintikul, J. Cherayath, P. Aksit, S. N. Gupta, *et al.*, "Evaluation of Diffuse Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Cardiac Magnetic Resonance Contrast-Enhanced T1 Mapping," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 52, pp. 1574-1580, 2008.
- [81] P. Kellman, J. R. Wilson, H. Xue, W. P. Bandettini, S. M. Shanbhag, K. M. Druey, *et al.*, "Extracellular volume fraction mapping in the myocardium, part 2: initial clinical experience," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 14, p. 64, 2012.
- [82] P. Kellman, J. R. Wilson, H. Xue, M. Ugander, and A. E. Arai, "Extracellular volume fraction mapping in the myocardium, part 1: evaluation of an automated method," *J Cardiovasc Magn Reson*, vol. 14, p. 63, 2012.
- [83] D. Périé, N. Dahdah, A. Foudis, and D. Curnier, "Multi-parametric MRI as an indirect evaluation tool of the mechanical properties of in-vitro cardiac tissues," *BMC Cardiovascular Disorders*, 2013.

- [84] D. A. Binks, R. J. Hodgson, M. E. Ries, R. J. Foster, S. W. Smye, D. McGonagle, *et al.*, "Quantitative parametric MRI of articular cartilage: a review of progress and open challenges," *The British Journal of Radiology*, vol. 86, p. 20120163, 2013.
- [85] A. Borthakur, P. M. Maurer, M. Fenty, C. Wang, R. Berger, J. Yoder, *et al.*, "T1 ρ MRI and Discography Pressure as Novel Biomarkers for Disc Degeneration and Low Back Pain," *Spine*, vol. 36, pp. 2190-2196, 2011.
- [86] S. Hoppe, S. Quirbach, T. C. Mamisch, F. G. Krause, S. Werlen, and L. M. Benneker, "Axial T2* mapping in intervertebral discs: a new technique for assessment of intervertebral disc degeneration," *European Radiology*, vol. 22, pp. 2013-2019, 2012.
- [87] G. E. Wesbey, C. B. Higgins, M. T. McNamara, B. L. Engelstad, M. J. Lipton, R. Sievers, *et al.*, "Effect of gadolinium-DTPA on the magnetic relaxation times of normal and infarcted myocardium," *Radiology*, vol. 153, pp. 165-169, 1984.
- [88] G. Strich, P. L. Hagan, K. H. Gerber, and R. A. Slutsky, "Tissue distribution and magnetic resonance spin lattice relaxation effects of gadolinium-DTPA," *Radiology*, vol. 154, pp. 723-726, 1985.
- [89] J. J. Green, J. S. Berger, C. M. Kramer, and M. Salerno, "Prognostic Value of Late Gadolinium Enhancement in Clinical Outcomes for Hypertrophic Cardiomyopathy," *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 5, pp. 370-377, 2012.
- [90] R. Rubinshtein, J. F. Glockner, S. R. Ommen, P. A. Araoz, M. J. Ackerman, P. Sorajja, *et al.*, "Characteristics and Clinical Significance of Late Gadolinium Enhancement by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy," *Circulation: Heart Failure*, vol. 3, pp. 51-58, January 1, 2010.
- [91] C. T. Nguyen, J. Dawkins, E. M. Tunnicliffe, X. Bi, M. D. Robson, D. Li, *et al.*, "Characterization of myocardial fiber orientation to assess therapeutic exosomes from cardiosphere-derived cells (CDCs) in myocardial infarcted porcine with in vivo diffusion-tensor CMR on a clinical scanner," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 18, pp. 1-2, 2016.

ANNEXES

Annexe 1 : Définition de la règle des 3R selon le Conseil Canadien de Protection des Animaux

« À propos des Trois R :

Le concept des Trois R (c.-à-d. le remplacement, la réduction et le raffinement) guide l'utilisation éthique des animaux en science.

- Le remplacement désigne les méthodes qui évitent ou remplacent l'utilisation des animaux dans un domaine où il est d'usage de les utiliser
- La réduction désigne toutes les stratégies dont le résultat se traduit par une diminution dans le nombre d'animaux utilisés
- Le raffinement désigne les modifications apportées aux méthodes d'élevage ou aux procédures expérimentales afin de réduire la douleur et la détresse

Le concept des Trois R, issu de la communauté des chercheurs, est largement reconnu comme la pierre angulaire des politiques mondiales en science faisant appel à l'utilisation d'animaux. L'utilisation éthique des animaux exige de tenir compte des besoins propres au bien-être animal.

Les revues spécialisées et les sites Web de centres des Trois R dans le monde publient de l'information sur le progrès de la science dans le domaine des Trois R.

Au Canada, la surveillance de l'utilisation des animaux à des fins scientifiques relève du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Veuillez consulter le site Web du CCPA pour en savoir plus. »

Tiré du site du CCPA (Conseil Canadien de Protection des Animaux) : <http://3rs.ccac.ca/fr/a-propos/>