

Titre: Caractérisation in vivo de l'agrégation des globules rouges chez des
Title: sujets normaux et diabétiques

Auteur: Linh-Chi Nguyen Thi
Author:

Date: 2008

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Nguyen Thi, L.-C. (2008). Caractérisation in vivo de l'agrégation des globules
Citation: rouges chez des sujets normaux et diabétiques [Master's thesis, École
Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8229/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/8229/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Yves Goussard, & Guy Cloutier
Advisors:

Programme: Unspecified
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**CARACTÉRISATION *IN VIVO* DE L'AGRÉGATION
DES GLOBULES ROUGES
CHEZ DES SUJETS NORMAUX ET DIABÉTIQUES**

LINH-CHI NGUYEN THI
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Maîtrise ès sciences appliquées
(Génie biomédical)
DÉCEMBRE 2008

© Linh-Chi Nguyen Thi, 2008



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-48932-1
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-48932-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

**CARACTÉRISATION *IN VIVO* DE L'AGRÉGATION
DES GLOBULES ROUGES
CHEZ DES SUJETS NORMAUX ET DIABÉTIQUES**

présenté par: NGUYEN THI Linh-Chi

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

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

M. LESAGE Frédéric, Ph.D., président

M. GOUSSARD Yves, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. CLOUTIER Guy, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. CHIASSON Jean-Louis, MD., membre

REMERCIEMENTS

Je remercie le D^r Guy Cloutier qui m'a accueilli dans son laboratoire. Grâce à lui, j'ai découvert le milieu de la recherche dans un environnement accueillant et stimulant. Je remercie également D^r Yves Goussard qui m'a permis de réaliser un baccalauréat-maîtrise intégré à l'École Polytechnique de Montréal, les radiologues du CHUM (D^r Gilles Soulez, D^r Pierre Robillard et D^r Marie-France Giroux) pour leur précieuse collaboration en clinique, et D^r Emilie Franceschini pour l'utilisation de son algorithme de caractérisation de l'agrégation érythrocytaire.

J'exprime également toute ma reconnaissance aux diverses personnes suivantes ayant participé à l'avancement de mon projet :

- D^r Louise Allard pour son aide dans l'organisation du projet clinique;
- M^{me} Sylvie Blaquière pour les prises de sang;
- M^{me} Nathalie Bellavance pour le recrutement des patients diabétiques;
- M. François Yu pour le partage de ses connaissances sur l'agrégation des globules rouges et sur les mécanismes de propagation des ultrasons dans les tissus humains;
- M^{lle} Élisabeth Mercure pour son assistance technique lors du projet;
- à l'équipe de radiologie de l'Hôtel-Dieu du CHUM (M^{me} Sylvie Benoît, M^{me} Martine Laferrière, M. Martin Gravel) ainsi qu'à celle de l'hôpital Notre-Dame du CHUM (M^{me} Nicole Langlois et M^{me} Vicky Tiffault); et finalement
- aux D^r Stéphane Elkouri et D^r Jean-Louis Chiasson pour leur collaboration clinique ainsi que pour la sélection de patients de leur clinique respective.

J'aimerais finalement remercier les Instituts de recherche en santé du Canada pour la subvention ayant permis la réalisation de ce projet clinique, ainsi que le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, la Fondation du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, et la Fondation de l'École Polytechnique pour m'avoir soutenu financièrement lors de mes études.

RÉSUMÉ

Plusieurs études ont démontré que l'hyperagrégation érythrocytaire est liée à des pathologies circulatoires telles que le diabète. Cependant, aucune de ces études n'a réalisé de mesures quantitatives *in situ* d'agrégation érythrocytaire (AE) corrélées à des désordres vasculaires.

L'objectif de ce projet est de caractériser l'AE *in vivo* et *in situ* à l'aide des ultrasons à haute fréquence (25 MHz et 35 MHz). Des signaux rétrodiffusés dans les veines du bras et du pied ont été enregistrés chez des sujets témoins (N=10) et des diabétiques de type 2 atteints d'artériopathie des membres inférieurs (N=10).

Les hypothèses du projet sont que l'AE serait plus élevée chez les sujets diabétiques que chez les sujets témoins, et que les ultrasons à haute fréquence pourraient quantifier l'agrégation *in situ*.

Deux paramètres d'agrégation *in vivo* $D.\gamma$ et $W.\gamma$ (D et W ayant été obtenus à partir d'un estimateur de taille et d'atténuation par le facteur de structure, et γ à partir de mesures hémodynamiques) ont été calculés pour chaque patient. D représente la dimension moyenne des agrégats, W le facteur d'organisation spatial de ces agrégats et γ le taux de cisaillement de l'écoulement sanguin. De plus, des données biochimiques, l'index tibial-huméral, ainsi que des index d'agrégation *in vitro* par rétrodiffusion laser ont été mesurés afin de valider les résultats *in vivo*.

Les résultats montrent que $D.\gamma$ et $W.\gamma$ sont plus élevés chez les diabétiques que les témoins à 25 MHz et à 35 MHz. Ceci révèle que l'agrégabilité des érythrocytes est supérieure chez le groupe pathologique, ce que confirme les index *in vitro*. Par contre, aucune différence significative n'a été relevée entre les mesures ultrasonores réalisées au niveau de la veine du bras et celles effectuées sur une veine du pied pour les deux groupes d'individus de ce projet (sujets normaux témoins et patients diabétiques). Ceci suggère donc que l'hyperagrégation chez les diabétiques atteints d'artériopathie ne serait

pas un phénomène localisé au pied, où se retrouve habituellement les symptômes sévères de la maladie, mais qui se répandrait dans la circulation systémique.

L'hyperagrégation érythrocytaire, les désordres hémodynamiques artériels et veineux ainsi qu'un niveau d'inflammation élevé lié à la pathogénèse du diabète sont des phénomènes qui ont été observés dans cette étude. En conclusion, ce projet pilote réalisé avec des ultrasons à haute fréquence montre que cette méthode ouvre la voie à une meilleure compréhension de l'impact *in vivo* de l'AE en relation avec les maladies vasculaires.

Mots clefs : Agrégation des globules rouges, rétrodiffusion ultrasonore, mesures *in vivo*, diabète, artériopathie des membres inférieurs.

ABSTRACT

Many studies have correlated red blood cell (RBC) hyperaggregation with circulatory pathologies such as diabetes mellitus. However, none of these studies have measured quantitative values of RBC aggregation *in situ* in relation to vascular diseases.

This study characterized RBC aggregation *in situ* and *in vivo* with high frequency ultrasound at 25 MHz and 35 MHz. Backscattered signals from veins of the upper and lower limbs were measured in 10 normal subjects and 10 patients with type 2 diabetes affected by lower limb arterial disease.

The hypotheses of this project were that RBC aggregation is higher in the diabetic group than in the control group, and that high frequency ultrasound could quantify RBC aggregation *in situ*.

Two *in vivo* aggregation parameters $D \cdot \gamma$ and $W \cdot \gamma$ (with D and W being computed with the structure factor size and attenuation estimator, and γ with hemodynamic measurements) were determined for each subject. D represents the mean size of aggregates, W the packing factor describing the spatial organization of these aggregates, and γ the shear rate of flowing blood. Moreover, biochemical data, the ankle-brachial index and *in vitro* aggregation indices obtained with laser backscattering were also measured to validate the *in vivo* parameters.

Our results show that $D \cdot \gamma$ and $W \cdot \gamma$ are higher in diabetic patients than in control subjects at 25 MHz and 35 MHz. This reveals that the RBC aggregability is more elevated in the pathological group, which is consistent with the *in vitro* aggregation indices also measured. However, no significant difference was found between the *in vivo* results over the arm vein and the foot vein. This suggests that hyperaggregation in diabetic patients with lower limb arterial disease is not localised in the foot, where severe symptoms often occur, but is generalized in the systemic circulation.

RBC hyperaggregation, arterial and venous hemodynamic disorders, and a high level of inflammation are phenomena that have been observed in diabetic patients in this study. In conclusion, this project that used high frequency ultrasound shows that this method opens the field to a better understanding of the *in vivo* impact of RBC aggregation on vascular diseases.

Key words: Red blood cell aggregation, ultrasound backscattering, *in vivo* assessment, diabetes, lower limb arteriopathy.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ANNEXES.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XV
1. INTRODUCTION.....	1
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
2.1 Phénomène d'agrégation érythrocytaire.....	3
2.1.1 Composition du sang.....	3
2.1.2 Théories sur les mécanismes d'agrégation érythrocytaire.....	4
2.1.3 La circulation sanguine	5
2.1.4 Facteurs influençant l'agrégation érythrocytaire.....	8
2.1.5 Agrégation érythrocytaire et pathologies associés	10
2.2 Application des ultrasons en médecine et en hémorhéologie.....	11
2.2.1 Définition et mécanisme de propagation d'une onde ultrasonore	11
2.2.2 Ultrasons appliqués en médecine vasculaire	14
2.2.3 Diffusion des ultrasons par les érythrocytes.....	17
2.2.4 Autres méthodes proposées pour caractériser l'agrégation érythrocytaire	18
2.2.5 Caractérisation ultrasonore in vivo des agrégats érythrocytaires	19
2.3 Pied diabétique et hyperagrégation érythrocytaire.....	19
2.3.1 Diabète de type 2 et pied diabétique	20
2.3.2 Hyperagrégation érythrocytaire chez les patients diabétiques.....	23
2.4 Objectifs du projet	24
3. MÉTHODOLOGIE.....	25
3.1 Sélection des patients	25

3.2 Méthodes de collecte de données.....	27
3.3 Analyse sanguine.....	27
3.3.1 Analyse biochimique.....	27
3.3.2 Mesures d'agrégation in vitro avec l'agrégamètre laser.....	28
3.4. Examen échographique vasculaire.....	29
3.4.1 Pré-examen.....	30
3.4.2 Mesures d'agrégation ultrasonores in vivo.....	34
3.4.3 Calcul des paramètres d'agrégation in vivo.....	35
3.5 Analyses statistiques.....	40
4. RÉSULTATS.....	41
4.1 Données physiologiques.....	41
4.2 Indices d'agrégation in vitro.....	42
4.3 Données hémodynamiques.....	44
4.4 Échogénicité sanguine in vivo.....	46
4.4.1 Paramètres d'agrégation in vivo.....	46
4.4.2 Paramètres d'atténuation.....	50
5. DISCUSSION.....	53
5.1 Données physiologiques.....	53
5.2 Indices d'agrégation in vitro.....	54
5.3 Données hémodynamiques.....	55
5.4 Indices d'agrégation in vivo.....	57
5.4.1 Comparaison des paramètres d'agrégation in vivo.....	57
5.4.2 Comparaison des valeurs d'atténuation.....	59
5.5 Hyperagrégation érythrocytaire et mesures ultrasonores in vivo.....	61
5.6 Critique sur la sélection des patients.....	62
5.7 Limitations et améliorations possibles du protocole.....	65
CONCLUSION.....	68
BIBLIOGRAPHIE.....	69
ANNEXES.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Diamètres, vitesses et débits de différents vaisseaux chez l'humain.....	6
Tableau 2.2 : Coefficients d'atténuation β de certains tissus biologiques.....	13
Tableau 2.3 : Équilibre glycémique selon le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1C).....	20
Tableau 2.4 : Classification des artériopathies des membres inférieurs selon Rutherford	22
Tableau 3.1 : Diagnostic clinique des patients diabétiques recrutés pour ce projet	26
Tableau 4.1 : Paramètres physiologiques mesurés pour les sujets normaux et diabétiques atteints d'artériopathie des membres inférieurs	41
Tableau 4.2 : Index d'agrégation <i>in vitro</i> mesurés avec l'érythro-agrégamètre laser à un hémocrite de 40% pour les sujets témoins et diabétiques.....	42
Tableau 4.3 : Index d'agrégation <i>in vitro</i> mesurés avec l'érythro-agrégamètre laser à un hémocrite non ajusté pour les sujets témoins et diabétiques.....	43
Tableau 4.4 : Paramètres hémodynamiques veineux calculés pour les sujets témoins et diabétiques	44
Tableau 4.5 : Paramètres hémodynamiques artériels calculés pour les sujets témoins et diabétiques	45
Tableau 4.6 : Équations des régressions linéaires de l'atténuation α des sujets témoins (Ctr) et diabétiques (Diab) en fonction de l'épaisseur de la peau ainsi que les coefficients de régression (R^2) correspondant à 25 MHz et 35 MHz au bras et au pied.....	52
Tableau 5.1 : Comparaison des différents coefficients d'atténuation (β) mesurés <i>in vivo</i> selon la littérature.....	60
Tableau 5.2 : Liste des médicaments (Rx) consommés par les patients diabétiques et leur effet sur la rhéologie sanguine. (a) Liste de Rx trouvés ayant un effet connu sur l'agrégation érythrocytaire selon la littérature ; (b) Liste de Rx ayant aucun effet connu selon la littérature.....	64
Tableau D.1 : Paramètres d'agrégation <i>in vivo</i> obtenus pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 25 MHz	81
Tableau D.2 : Paramètres d'agrégation <i>in vivo</i> obtenus pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 35 MHz	82

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	
Calculs de la vitesse en mode Doppler	75
Annexe B	
Calculs des index de vitesse pour les artères	78
Annexe C	
Approximation du facteur de structure	79
Annexe D	
Résultats détaillés des paramètres <i>in vivo</i>	81

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : (a) Constituants du sang après centrifugation; (b) Dimension d'un globule rouge	4
Figure 2.2 : (a) Globules rouges désagrégés; (b) et (c) Globules rouges agrégés	5
Figure 2.3 : Profils de vitesse théoriques d'un écoulement tubulaire en régime laminaire et turbulent	6
Figure 2.4 : Exemple de vitesse artérielle en fonction du temps (écoulement triphasé)	8
Figure 2.5 : Viscosité du sang (η) en fonction des tailles d'agrégats modulées par le cisaillement (γ)	9
Figure 2.6 : Mécanismes pouvant expliquer le lien entre les pathologies vasculaires, l'agrégation des globules rouges (GR) et la rhéologie sanguine	11
Figure 2.7 : Propagation d'une onde ultrasonore, (1) propagation, (2) réflexion, et (3) diffusion	12
Figure 2.8 : Illustration de signaux RF atténués par différents tissus. (a) Tissu avec une atténuation de 1 dB/cm.MHz ; (b) Tissu avec une atténuation de 4 dB/cm.MHz.	14
Figure 2.9 : Illustration de l'effet Doppler	16
Figure 2.10 : Tracés Doppler pour quelques écoulements artériels	17
Figure 3.1 : Localisation approximative des vaisseaux sanguins imagés	32
Figure 3.2 : Vitesse au centre du vaisseau en fonction du temps dans une veine céphalique	33
Figure 3.3 : Étapes utilisées pour calculer D , W et α dans les veines céphalique et saphène interne	39
Figure 4.1 : Le paramètre D . γ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Ctr - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 25 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %	47
Figure 4.2 : Le paramètre W . γ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Ctr - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied	

(SAI) à 25 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %..... 48

Figure 4.3 : Le paramètre $D.\gamma$ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Ctr - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 35 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %..... 49

Figure 4.4 : Le paramètre $W.\gamma$ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Ctr - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 35 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %..... 50

Figure 4.5 : Coefficient d'atténuation α (dB/MHz) en fonction de l'épaisseur de la peau du pied chez les patients diabétiques à 25 MHz. Une régression linéaire de type $y = \beta x + b$ est tracée, où β représente la pente de la droite, x , l'épaisseur de la peau et b , une constante à l'origine. R^2 est le coefficient de régression de la droite. 51

Figure A.1 : Différence des spectres du signal transmis et reçu (encadré rouge)..... 76

Figure A.2 : (a) Volume d'échantillon sur l'image mode B ; (b) et (c) Spectres Doppler obtenus en appliquant une différence de fréquence, (d) Portion du spectre représentée sur l'échelle temporelle..... 77

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

a :	Rayon d'un globule rouge
α :	Coefficient d'atténuation en dB/MHz
$\alpha(f)$:	Coefficient d'atténuation en dB/cm en fonction de la fréquence
AE :	Agrégation érythrocytaire
A(k)	Exponentielle d'atténuation
A_0 :	Amplitude initiale
A_f :	Amplitude finale
AMI :	Artériopathie des membres inférieurs
ARA II :	Antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II
β :	Coefficient d'atténuation en dB/MHz.cm
b :	Constante pour la régression de l'atténuation en fonction de l'épaisseur de la peau
BSC_{exp} :	Coefficient de rétrodiffusion ultrasonore (Backscattering Coefficient) expérimental
BSC_{H6} :	Coefficient de rétrodiffusion ultrasonore du milieu H6
BSC_{theo} :	Coefficient de rétrodiffusion ultrasonore théorique
c :	Célérité
CEP :	Veine céphalique (veine du bras)
CFS_A :	<i>Centroid frequency shift</i> par spectre autorégressif
Chol :	Cholestérol total
CRP :	Protéine C-réactive (C-reactive protein)
D :	Diamètre isotrope d'un agrégat (lié à la taille des agrégats)
D_i	Diamètre du vaisseau i
d :	Distance parcourue
EDTA :	Anticoagulant (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)
Δf :	Différence de fréquence

ΔP :	Différence de pression
Fb :	Fibrinogène
f_i :	Fréquence de l'onde incidente
γ :	Taux de cisaillement
$\bar{\gamma}$:	Taux de cisaillement moyen
γ_D :	Taux de dissociation total
γ_s :	Taux de dissociation partiel
γ_z :	Impédance acoustique relative du sang
η :	Viscosité du fluide
H :	Hématocrite
H6 :	Suspension de sang à 6% d'hématocrite
HbA1C :	Hémoglobine glyquée
HDL :	Lipoprotéine à haute densité
Hp :	Haptoglobine
HUM :	Artère humérale (artère du bras)
$g(r)$:	Fonction représentant la probabilité de trouver deux particules séparés d'une distance r
g_{sub} :	Gras sous-cutané
IECA :	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IgG :	Immunoglobuline G
IMC :	Indice de masse corporel
ITH :	Index tibial-huméral
k :	Nombre d'onde
LDL :	Lipoprotéine à basse densité
m :	Densité en nombre de globules rouges
max :	Maximum
med :	Médiane
min :	Minimum
MNB :	<i>Multi-narrowband</i>

n :	Constante reliée au profil de vitesse dans un écoulement tubulaire
N :	Nombre d'échantillons
PED :	Pédieuse superficielle (artère du pied)
PI :	Indice de pulsatilité Doppler
Q :	Débit
r :	Rayon du vaisseau
R :	Rayon d'un agrégat tridimensionnel
R^2 :	Coefficient de régression
RI :	Index de résistivité Doppler
ROI :	Région d'intérêt (region of interest)
R_v :	Résistance vasculaire
Rx :	Médicaments
RF :	Radio-fréquence
σ_b :	Rétrodiffusion transversale d'un seul globule rouge
S_{10} :	Indice cinétique moyen après 10 secondes
S_i :	Densité spectrale de puissance du signal i
$S(k)$:	Facteur de structure en fonction du nombre d'ondes
$SFSAE$:	Structure Factor Size and Attenuation Estimator
SAI :	Veine saphène interne (veine du pied)
τ :	Force de cisaillement
t_A :	Temps d'agrégation
t_F :	Temps d'agrégation final
$T.Hilbert$:	Transformée de Hilbert
Tri :	Triglycérides
U :	Vitesse dans un écoulement de Poiseuille
$V_{max_syst_i}$:	Vitesse maximale systolique de l'artère i
V_{moy} :	Vitesse moyenne au centre du vaisseau
V_s :	Volume d'un globule rouge
VP :	Viscosité plasmatique

VS : Viscosité sanguine
W : Facteur d'organisation spatial

1. INTRODUCTION

L'agrégation érythrocytaire (AE) est un phénomène qui est naturel et réversible. Lorsque les globules rouges s'agrègent, ceux-ci forment des rouleaux ou des réseaux tridimensionnels complexes qui résultent d'un équilibre des forces d'adhésion et de répulsion entre chaque globule. Cependant, l'hyperagrégation érythrocytaire a été observée pour plusieurs pathologies circulatoires telles que les thromboses veineuses, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et le diabète. Diverses méthodes existent pour caractériser l'AE mais la plupart requiert la prise d'un échantillon de sang et l'analyse dans un instrument de laboratoire. Pour sa part, la technique ultrasonore permet une caractérisation *in situ* et *in vivo* de ce phénomène, d'où l'importance d'approfondir cette technique.

Beaucoup de travaux ont étudié l'AE avec les ultrasons mais la plupart ont été réalisés *in vitro*. De plus, aucune étude quantitative de l'AE n'a été effectuée pour corréler l'agrégation *in vivo* avec des désordres vasculaires.

L'objectif de ce projet pilote était donc de caractériser l'AE *in vivo* et *in situ* dans les veines du bras et du pied de sujets sains et diabétiques avec les ultrasons à haute fréquence. À partir du signal de radio-fréquence rétrodiffusé par les globules rouges, les paramètres d'AE *in vivo* estimés à partir d'un estimateur de taille et d'atténuation par le facteur de structure et à partir des mesures hémodynamiques, ont été comparés entre les deux populations étudiées. Des données biochimiques sanguines, l'index tibial-huméral, et des index d'agrégation *in vitro* par rétrodiffusion laser ont également été mesurés afin de valider les mesures d'agrégation *in vivo*.

Le présent mémoire est constitué des quatre parties suivantes : la revue de la littérature, la méthodologie, les résultats et la discussion. La revue de la littérature explique les théories menant à l'existence de l'AE, l'application des ultrasons pour caractériser l'AE, l'artériopathie des membres inférieurs en lien avec le diabète de type 2, et les désordres rhéologiques en relation avec le diabète. La méthodologie décrit les

principales étapes du protocole expérimental. Les résultats présentent les mesures obtenues sur les deux groupes de participants, c'est-à-dire les données physiologiques, les index d'agrégation *in vitro*, les données hémodynamiques, les paramètres d'agrégation *in vivo*, et les coefficients d'atténuation de la peau. Finalement, la discussion est consacrée à l'analyse des résultats obtenus ainsi que des suggestions d'améliorations du protocole.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Dans ce chapitre seront abordées les sous-sections suivantes : (1) le phénomène d'agrégation érythrocytaire, (2) l'application des ultrasons en médecine et en hémorhéologie, et (3) le diabète et l'hyperagrégation érythrocytaire.

2.1 Phénomène d'agrégation érythrocytaire

L'agrégation érythrocytaire est un processus normal et réversible qui a lieu dans la circulation sanguine, elle joue un rôle important dans la régulation de la rhéologie sanguine. Il a été observé que l'hyperagrégation est reliée à des désordres circulatoires, d'où l'importance de bien comprendre ce phénomène.

2.1.1 Composition du sang

Le sang se compose de quatre constituants, soit les globules rouges, les globules blancs, les plaquettes, et le plasma (**Figure 2.1 (a)**). Les globules rouges sont des cellules procaryotes ayant une forme de disque biconcave qui mesurent en moyenne 8 μm de diamètre et 2 μm d'épaisseur [1] (**Figure 2.1 (b)**). Ils transportent entre autre l'oxygène et le dioxyde de carbone grâce à l'hémoglobine qui s'y retrouve, et jouent un rôle crucial pour l'approvisionnement des tissus et organes en nutriments. La fraction volumique de globules rouges par rapport au volume sanguin se définit comme étant l'hématocrite, qui se situe généralement entre 35 et 45 % pour un individu normal.

Le plasma sanguin est le liquide dans lequel baignent les cellules sanguines et les plaquettes. Dans le plasma, des ions, des nutriments et de nombreuses protéines plasmatiques y sont dissous. Certaines protéines plasmatiques telles que le fibrinogène (voir section 2.1.2), jouent un rôle majeur dans l'agrégation érythrocytaire. D'autres

protéines plasmatiques telles que les immunoglobulines, l'haptoglobine, la glycoprotéine α -acide et l'albumine influenceraient aussi ce phénomène [2].

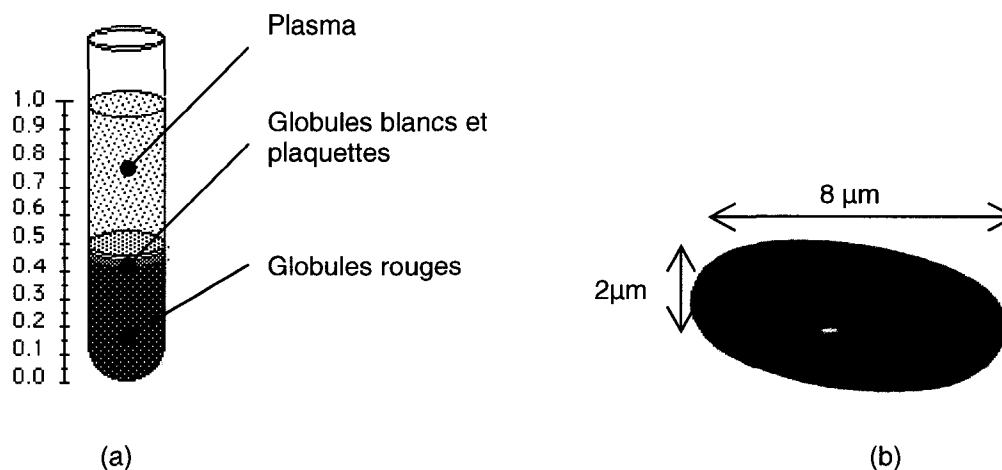


Figure 2.1 : (a) Constituants du sang après centrifugation; (b) Dimension d'un globule rouge

(Tirée de <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/nh/intronormal.cfm> et de <http://www.med.nyu.edu/patientcare/library/article.html?ChunkIID=100693>, consulté en mars 2008)

2.1.2 Théories sur les mécanismes d'agrégation érythrocytaire

Lorsque les globules rouges s'agrègent, ceux-ci forment des rouleaux ou des réseaux complexes tridimensionnels (**Figure 2.2**). Deux modèles théoriques tentent d'expliquer le phénomène d'agrégation : la théorie de l'adsorption [3, 4] et celle de la déplétion [5]. La théorie de l'adsorption repose sur l'attraction entre les globules rouges et le fibrinogène ou toute autre protéine plasmatique de poids moléculaire important. Lorsque le fibrinogène se dépose sur la membrane de l'érythrocyte, celui-ci se fait adsorber par le globule rouge, et un pont d'union se crée entre deux globules rouges. La théorie de la déplétion repose sur la création d'une zone de déplétion, c'est-à-dire une zone ayant une concentration de fibrinogène plus faible par rapport au reste de l'espace intercellulaire. Lorsque deux zones de déplétion se chevauchent, les globules rouges

auraient tendance à s'agréger par osmose. L'attraction entre les deux globules rouges serait le résultat de cette dépression osmotique. Les plus récentes études semblent privilégier le modèle de la déplétion car il permettrait d'expliquer l'agrégation entre certains types de polymères et les globules rouges [6]. Un lien entre le rayon de giration des protéines plasmatiques à haut poids moléculaire, dont le fibrinogène, et le mécanisme de déplétion aurait été identifié par ce modèle.

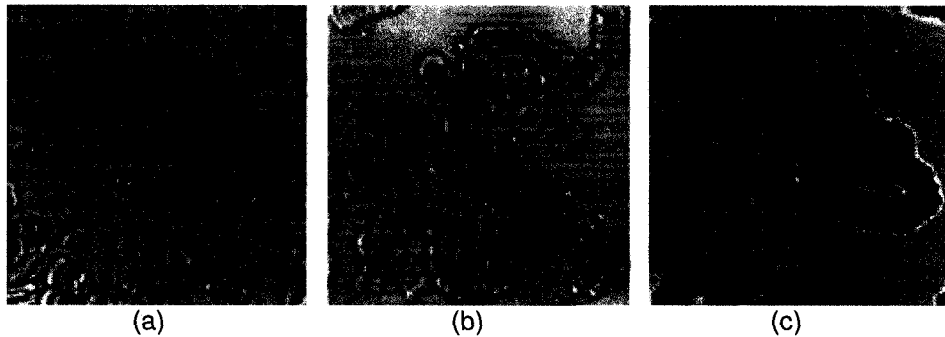


Figure 2.2 : (a) Globules rouges désagrégés; (b) et (c) Globules rouges agrégés
(Tirée de [7])

2.1.3 La circulation sanguine

Le sang circule dans un immense réseau de vaisseaux sanguins composé d'artères, de veines et de capillaires. Les artères transportent le sang oxygéné au tissu. Les plus petites artères, les artérioles, régulent le débit sanguin par la vasodilatation ou la vasoconstriction. Les capillaires, quant à eux, servent d'échange entre les artérioles et les différents tissus et organes du corps. Finalement, les veines retournent le sang vicié vers le cœur et les poumons.

L'écoulement sanguin possède les différentes caractéristiques suivantes :

(1) Le débit (Q) varie en fonction de la différence de pression (ΔP), et de la résistance vasculaire (R_v) selon l'équation suivante :

$$Q = \frac{\Delta P}{R_v} \quad (\text{eqn 2.1})$$

L'écoulement est plus rapide dans les artères que dans les veines car ΔP est beaucoup plus élevée dans les artères. À titre indicatif, le **tableau 2.1** montre les ordres de grandeur de diamètres, vitesses et débits dans différents vaisseaux chez l'humain.

Tableau 2.1 : Diamètres, vitesses et débits de différents vaisseaux chez l'humain

Vaisseau	Diamètre moyen (mm)	Vitesse moyenne (cm/s)	Débit moyen* (cm ³ /s)
Aorte descendante	23,0-43,5	245-876	$4,07 \times 10^3 - 5,21 \times 10^4$
Petites artères	0,3	50	$1,41 \times 10^{-1}$
Artérioles	0,025	5	$9,82 \times 10^{-5}$
Veinules	0,03	0,082	$2,32 \times 10^{-6}$
Petites veines	1,8	1,65	$1,68 \times 10^{-1}$
Veine cave	25	15,5	$3,04 \times 10^2$

* Débit moyen calculé en multipliant la vitesse moyenne par l'aire moyenne du vaisseau
(Tiré de [8] et de [9])

(2) Le flot sanguin est un écoulement de forme parabolique plus ou moins aplani à cause de la forme tubulaire du vaisseau. Des profils de vitesse théoriques pour ce type d'écoulement sont illustrés à la **figure 2.3** :

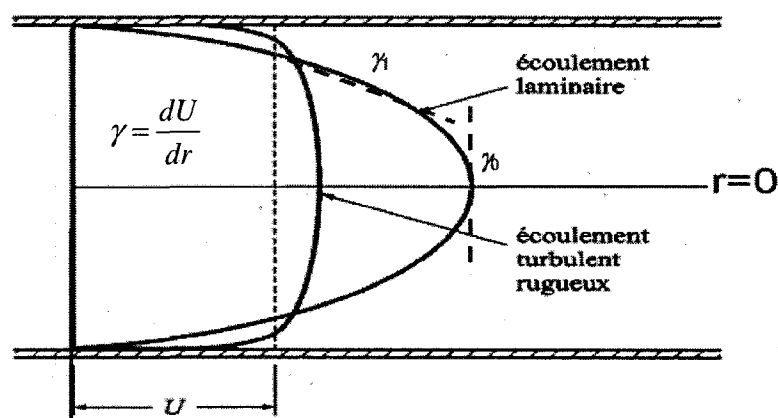


Figure 2.3 : Profils de vitesse théoriques d'un écoulement tubulaire en régime laminaire et turbulent

(Tirée de [10])

La force de cisaillement (τ) dans un tel vaisseau est représentée par l'équation suivante :

$$\tau = \eta\gamma \quad (\text{eqn 2.2})$$

où η est la viscosité du fluide et γ le taux de cisaillement obtenu par

$$\gamma = \frac{dU}{dr} . \quad (\text{eqn 2.3})$$

À l'équation 2.3, $\frac{dU}{dr}$ est la dérivée de la vitesse par rapport à la position radiale dans le vaisseau.

On remarque à l'équation 2.3 que le taux de cisaillement n'est pas spatialement homogène dans un écoulement tubulaire : il est nul au centre du tube et augmente vers les parois ($\gamma_0 < \gamma_1$, voir la **figure 2.3**). Nous considérons que le régime d'écoulement est laminaire dans la plupart des vaisseaux sauf ceux de gros calibres durant la systole, ou pour les vaisseaux tortueux [11] où nous considérons que le régime est perturbé. Un écoulement turbulent se rencontre principalement en aval de pathologies vasculaires telles que des sténoses artérielles.

(3) Certains flots sanguins sont pulsés comme l'écoulement artériel. Dans une artère saine au repos, la vitesse en fonction du temps est triphasée : la première phase correspond à la systole, la deuxième, au refoulement diastolique, et la troisième, à la diastole (**Figure 2.4**). La phase de refoulement diastolique peut être absente dans un réseau vasculaire à faible résistance, tel que le réseau carotidien. Quant aux veines, le flot est généralement plus constant sauf pour celles qui sont à proximité du cœur, telles les veines caves, et celles qui n'ont pas de valves, telles les veines hépatiques majeures [11].

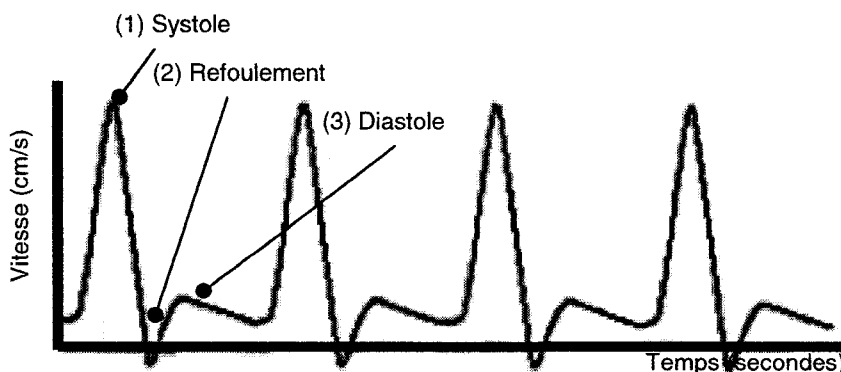


Figure 2.4 : Exemple de vitesse artérielle en fonction du temps (écoulement triphasé)
(tirée de [12])

(4) Le sang est un fluide non-newtonien, c'est-à-dire que sa viscosité n'est pas constante en fonction du cisaillement. À faible cisaillement, la viscosité sanguine est principalement déterminée par le niveau d'agrégation érythrocytaire. À l'inverse, à hauts cisaillements, la viscosité dépend de la rigidité des globules rouges. La propriété non-newtonienne est donc déterminée par l'état biomécanique des globules rouges. La **figure 2.5** illustre la viscosité sanguine en fonction de différents niveaux d'agrégats modulés par le taux de cisaillement.

2.1.4 Facteurs influençant l'agrégation érythrocytaire

L'agrégation érythrocytaire résulte d'un équilibre entre les forces d'agrégation et de désagrégation. La principale force de désagrégation est le cisaillement du flot, et la principale force d'agrégation, l'attraction entre les globules rouges en présence de protéines plasmatiques.

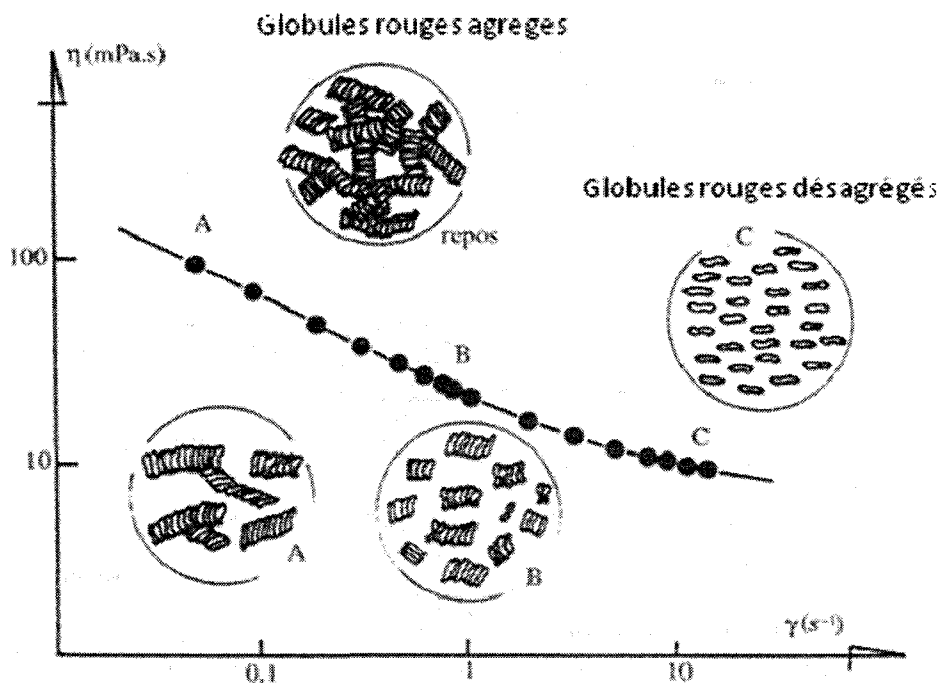


Figure 2.5 : Viscosité du sang (η) en fonction des tailles d'agrégats modulées par le cisaillement (γ)
(tirée de [13])

2.1.4.1 Force de cisaillement

L'influence du taux de cisaillement sur l'agrégation érythrocytaire est largement documentée dans la littérature. Il a été observé que les agrégats ont tendance à se former à des bas taux de cisaillement et à se dissocier à des hauts taux de cisaillements [14] [15]. En général, dans les veines, les vitesses (voir **tableau 2.1**), et donc également les taux de cisaillement, sont beaucoup moins élevées que dans les artères. Ainsi, Machi et al. ont observé que les agrégats tendent davantage à se former dans les veines que dans les artères dans des conditions d'écoulement [16] ¹.

¹ Cependant, des mesures de viscosimétrie à cisaillement contrôlé semblent montrer que la viscosité du sang veineux ne diffère pas du sang artériel chez des sujets normaux [17]

2.1.4.2 Interaction entre les globules rouges et les protéines plasmatiques

L'agrégation des globules rouges résulte de l'interaction entre ces cellules sanguines et les protéines plasmatiques. Ainsi, l'hématocrite et la concentration de fibrinogène ont un effet majeur sur l'agrégation érythrocytaire [3]. Tel que mentionné à la section 2.1.1, d'autres protéines inflammatoires telles que la protéine C-réactive, l'immunoglobuline G et l'haptoglobine jouent également un rôle dans l'AE [2]. Pour certaines pathologies comme le diabète, la concentration de ces protéines plasmatiques à haut poids moléculaire est généralement significativement plus élevée, et provoque une hyperagrégation (*voir section 2.3*). Les sangs des différentes espèces animales telles que le porc, le cheval et le bœuf ont également des propriétés d'agrégation différentes puisque l'hématocrite, des facteurs membranaires, la concentration de fibrinogène et autres protéines changent pour chaque espèce [18]. Ainsi, la vache serait un modèle animal qui agrège peu comparativement au cheval [19].

2.1.4.3 Autres paramètres influençant la rhéologie des érythrocytes

L'âge, le sexe de l'individu, le pH et la température du sang, la déformabilité et la forme du globule rouge sont d'autres paramètres qui peuvent faire varier le processus d'agrégation [3, 20, 21].

2.1.5 Agrégation érythrocytaire et pathologies associés

Tel que mentionné à la section 2.1.3, l'agrégation des globules rouges à bas cisaillement affecte la viscosité sanguine. Les propriétés circulatoires du sang se retrouvent modifiées et sont associées à plusieurs pathologies telles que l'hyperlipidémie [22], l'hypertension [23], l'obésité [24], l'infarctus du myocarde [25], l'athérosclérose [26], les thromboses [27], et le diabète (*voir section 2.3*).

La **figure 2.6** schématise les mécanismes pouvant expliquer le lien entre les pathologies vasculaires, l'agrégation érythrocytaire et la rhéologie sanguine.

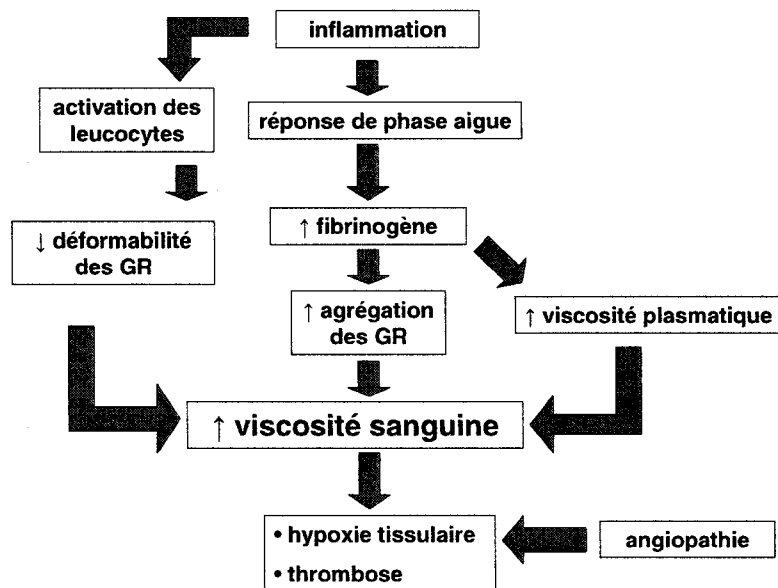


Figure 2.6 : Mécanismes pouvant expliquer le lien entre les pathologies vasculaires, l'agrégation des globules rouges (GR) et la rhéologie sanguine
(adaptée de [19] et de [28])

2.2 Application des ultrasons en médecine et en hémorhéologie

En médecine, les ultrasons ont commencé à être utilisés comme moyen de diagnostic pour imager des tissus dans les années 1970 [29], et ce, dans plusieurs spécialités telles que la gynécologie, l'obstétrique, la cardiologie et la médecine vasculaire. L'intérêt d'utiliser des ultrasons comme méthode d'imagerie résulte en sa capacité de produire des images en temps réel et ce de façon non-invasive. L'échographie pour caractériser l'agrégation érythrocytaire est donc une voie particulièrement intéressante pour ces mêmes raisons.

2.2.1 Définition et mécanisme de propagation d'une onde ultrasonore

Une onde sonore est une onde de pression qui se déplace dans un milieu élastique : ce milieu se comprime ou s'étire au passage de cette onde [29]. Les ultrasons font partie de la gamme des ondes sonores ayant une fréquence de 20 kHz et plus et sont

imperceptibles à l'oreille humaine. Quand une onde ultrasonore se propage dans un tissu, elle peut adopter trois comportements à une interface (**figure 2.7**) : une partie de cette onde peut continuer à (1) se propager, (2) être réfléchiée ou (3) être diffusée dans toutes les directions. L'onde se diffuse lorsque l'interface est irrégulière ou lorsqu'elle est composée de particules dont la taille est plus petite que la longueur d'onde du signal ultrasonore (*voir section 2.2.2*).

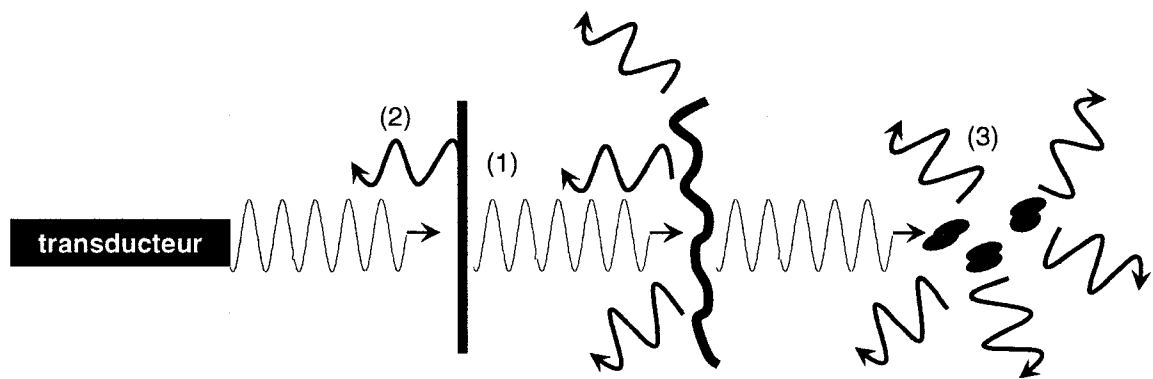


Figure 2.7 : Propagation d'une onde ultrasonore, (1) propagation, (2) réflexion, et (3) diffusion

Le transducteur ultrasonore est constitué d'un cristal piézo-électrique qui permet la conversion d'un signal électrique en onde acoustique, et vice-versa, de la façon suivante : lorsque le cristal est excité par un signal électrique, celui-ci envoie une onde de pression qui se propage. Ensuite, cette onde ultrasonore est réfléchiée ou diffusée aux interfaces, et est captée par le transducteur qui la convertit en signal de radio-fréquence (RF).

Lorsque l'onde ultrasonore se propage dans un milieu, son amplitude diminue en fonction de la distance parcourue, du type de tissu et de la fréquence du transducteur à cause de l'atténuation. La relation entre l'amplitude initiale de l'onde et son amplitude finale après une certaine distance est la suivante :

$$A_f = A_o e^{-\alpha(f) \times d} \quad (\text{eqn 2.4})$$

où A_f est l'amplitude finale de l'onde, A_o , son amplitude initiale, $\alpha(f)$, le coefficient d'atténuation en fonction de la fréquence, et d , la distance parcourue par l'onde. Pour des tissus mous en général, on assume une dépendance linéaire de l'atténuation en fonction de la fréquence [30] :

$$\alpha(f) = \beta \times f. \quad (\text{eqn 2.5})$$

Ainsi, β qui est exprimé en dB/MHz.cm ou en Np/MHz.cm, est un paramètre fréquemment utilisé pour caractériser les tissus biologiques. Le **tableau 2.2** indique quelques exemples de coefficients d'atténuation dans les tissus biologiques.

Tableau 2.2 : Coefficients d'atténuation β de certains tissus biologiques
(tiré de [29])

Tissus biologiques	Coefficient d'atténuation β (dB/cm.MHz)
Sang	0,2
Cerveau	0,5
Graisse	0,65
Foie	0,7
Rein	1,0
Muscle (direction transversale aux fibres)	1,3
Muscle (direction normale aux fibres)	1,12

On remarque que le coefficient d'atténuation augmente lorsque la composition en eau du tissu diminue. La **figure 2.8** illustre deux signaux de radio-fréquence atténués par différents tissus.

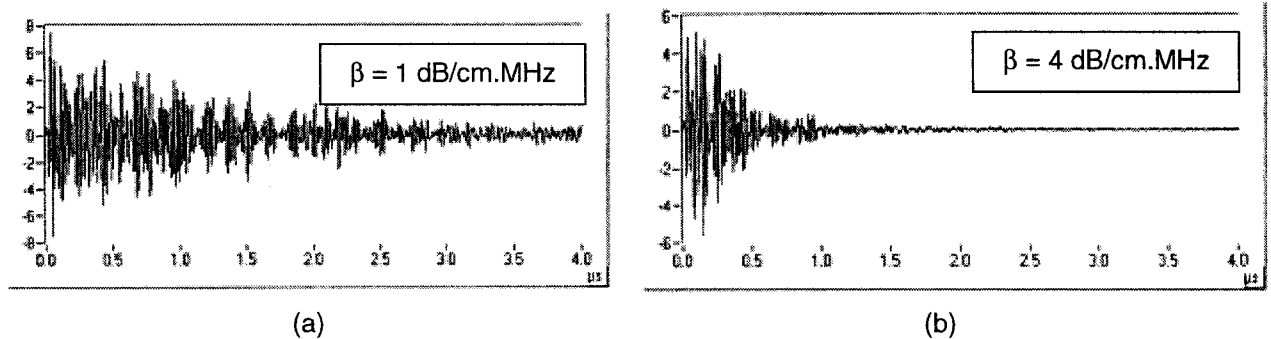


Figure 2.8 : Illustration de signaux RF atténués par différents tissus. (a) Tissue avec une atténuation de 1 dB/cm.MHz ; (b) Tissue avec une atténuation de 4 dB/cm.MHz.
(tirée de [31])

Une compensation de l'onde atténuée s'avère donc nécessaire si nous voulons une échogénicité spatialement homogène. Différentes méthodes existent pour estimer le coefficient d'atténuation d'un tissu tel que le *Multi-Narrowband*, le *Centroid Frequency Shift*, le *Log-Power Decay* [32], et le *Structure Factor Size and Attenuation Estimator* (voir section 3.4.3).

2.2.2 Ultrasons appliqués en médecine vasculaire

En médecine vasculaire, l'échographie est utilisée pour évaluer entre autres des obstructions d'artères (lésions athérosclérotiques) et des maladies thromboemboliques dans les veines. En clinique, cette modalité est souvent utilisée en duplex scan, c'est-à-dire que l'imagerie en mode B est couplée avec l'imagerie en mode Doppler.

2.2.2.1 Imagerie mode B

Le mode B est utilisé afin de visualiser le vaisseau d'intérêt en différents niveaux de gris. Les sondes échographiques employées en clinique sont des barrettes de transducteurs linéaires ou circulaires. La différence entre ces deux types de sondes est

que celle qui est circulaire permet une focalisation de l'onde de pression en une zone focale dans laquelle la résolution à cet endroit est maximale. L'utilisation de barrettes de transducteur permet de générer une image bidimensionnelle du vaisseau imagé. Une autre façon de générer une image 2-D est de mettre un seul transducteur en mouvement, soit en balayage linéaire ou circulaire. La relation entre les niveaux de gris de l'image mode B ($Image_{modeB}$) et les signaux de radio-fréquence ($Signal_{RF}$) est le suivant :

$$Image_{modeB} = \log_{10} \|T.Hilbert(Signal_{RF})\| \quad eqn (2.6)$$

où $T.Hilbert$ est la transformée de Hilbert qui permet d'obtenir l'enveloppe du signal RF.

2.2.2.2 Imagerie mode Doppler

Le mode Doppler qui est l'autre composante de l'examen duplex, permet de mesurer la vitesse du flot sanguin. Le principe de l'échographie Doppler s'énonce comme suit : lorsqu'une onde est émise vers un objet en mouvement, l'onde réfléchiée par cet objet voit sa fréquence modifiée. Si l'objet s'approche de la source émettrice, l'onde réfléchiée se retrouve comprimée (diminution de la fréquence). À l'inverse, elle devient dilatée si l'objet s'éloigne de la source émettrice (augmentation de la fréquence). L'effet Doppler est illustré à la **figure 2.9**.

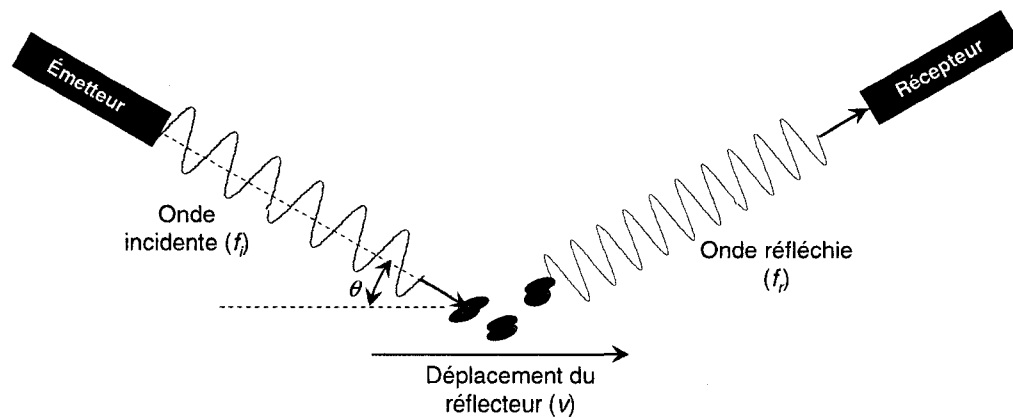


Figure 2.9 : Illustration de l'effet Doppler

Pour estimer la vitesse d'une particule sanguine en mode Doppler, celle-ci est calculée par l'équation suivante :

$$v = \frac{c \times \pm \Delta f}{2 f_i \cos \theta} \quad (\text{eqn 2.7})$$

où c est la vitesse de l'onde acoustique dans le milieu considéré, Δf la différence de fréquence entre l'onde incidente et l'onde réfléchie, f_i la fréquence de l'onde incidente et $\cos \theta$, le cosinus de l'angle formé entre la direction du flot et celle de la sonde. L'**annexe A** donne plus de détails sur le calcul de la vitesse en mode Doppler.

Les tracés Doppler permettent de déterminer, entre autres, la présence de sténoses artérielles et d'évaluer son pourcentage de réduction. La **figure 2.10** schématise quelques tracés Doppler provenant d'artères saines et pathologiques. Par sa modalité non-invasive qui permet d'imager des tissus en temps réel, les ultrasons utilisés pour diagnostiquer plusieurs pathologies peuvent caractériser les désordres hémorhéologiques dans des vaisseaux.

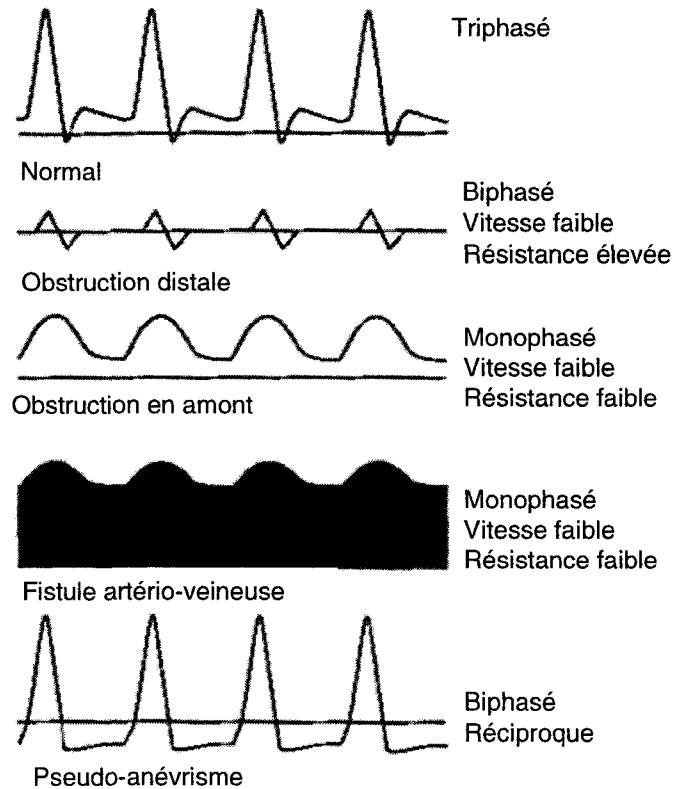


Figure 2.10 : Tracés Doppler pour quelques écoulements artériels.
(modifiée de [12])

2.2.3 Diffusion des ultrasons par les érythrocytes

L'échographie est également utilisée, à des fins de recherche, pour caractériser l'agrégation des globules rouges. L'échogénicité des tissus se quantifie par la puissance de l'onde rétrodiffusée par les érythrocytes², et se calcule par le coefficient de rétrodiffusion ultrasonore (BSC) modélisé par l'équation suivante :

$$BSC(k) = m\sigma_b(k)S(k) \quad (\text{eqn 2.8})$$

² La rétrodiffusion représente la portion de l'onde diffusée à 180 degrés par rapport à l'onde incidente.

où m est la densité en nombre des globules rouges, σ_b , la rétrodiffusion transversale d'un seul globule en $\text{cm}^{-1}.\text{sr}^{-1}$, S , le facteur de structure qui décrit l'organisation spatiale des érythrocytes, et k , le nombre d'onde en rad/m (voir section 3.4.3).

Dans la littérature, la diffusion par une faible concentration de particules suit la théorie de Rayleigh si la taille de ces particules est beaucoup plus petite que la longueur d'onde du signal ultrasonore incident. Pour des diffuseurs de Rayleigh, la puissance rétrodiffusée de ces particules est non-linéaire en fréquence et suit une dépendance à la puissance quatre. Les globules rouges non agrégés peuvent être considérés comme des diffuseurs de Rayleigh [33] puisque la taille de ces derniers est de l'ordre de 7 à 8 μm et que la longueur d'onde d'un signal ultrasonore à 35 MHz est d'environ 44 μm ³. Cependant, pour des globules rouges agrégés, les amas de diffuseurs ne sont plus considérés comme étant Rayleigh puisque la longueur d'onde incidente se rapproche de la taille des agrégats [34, 35]. Tel que montré dans ce mémoire, les ultrasons à haute fréquence (25 à 35 MHz de fréquence centrale) sont probants pour caractériser le phénomène d'agrégation érythrocytaire puisqu'ils sont sensibles aux cinétiques d'agrégation [35] et aux changements de taille des agrégats [36].

2.2.4 Autres méthodes proposées pour caractériser l'agrégation érythrocytaire

Il existe d'autres méthodes permettant la caractérisation de l'agrégation érythrocytaire telles que la sédimentation, la microscopie, la viscosimétrie et la rétrodiffusion laser. Toutes ces techniques nécessitent un prélèvement sanguin et sont donc invasives. De plus, en étudiant le sang *in vitro*, les conditions dynamiques du fluide se retrouvent modifiées. L'utilisation des ultrasons est donc une méthode qui permet d'étudier le sang *in vivo* et *in situ*, d'où l'importance d'approfondir davantage ce domaine.

2.2.5 Caractérisation ultrasonore *in vivo* des agrégats érythrocytaires

À ce jour, peu d'études sur la caractérisation ultrasonore de l'agrégation érythrocytaire ont été effectuées *in vivo* et *in situ*. Sigel et al. [37] ont trouvé que l'échogénicité du sang variait à travers la veine cave et ses différents affluents. Ils ont émis l'hypothèse que cette variation serait due à l'agrégation érythrocytaire qui serait modulée selon le cisaillement du flot, l'hématocrite et la concentration locale de fibrinogène. Par la suite, Machi et al [16], Wang et al [38] et Rouffiac et al. [39] ont comparé l'échogénicité *ex situ* dans des veines et artères en faisant des obstructions partielles ou complètes. Ces auteurs ont remarqué que les veines étaient généralement hyperéchogènes comparées aux artères, et qu'en occluant un vaisseau, l'échogénicité augmentait. Par ailleurs, Kitamura et al. [40] et Yu et al [41] ont réalisé des mesures d'agrégation érythrocytaire *in vivo* dans les veines, et ont également remarqué que l'échogénicité augmentait après l'occlusion du flot. La seule étude *in vivo* et *in situ* de l'agrégation érythrocytaire corrélée à une pathologie vasculaire a été publiée par Cloutier et al. [22]. Ces travaux réalisés par échographie Doppler ont montré que l'échogénicité sanguine était plus élevée chez les patients hyperlipidémiques et qu'elle différait selon le type de vaisseau sanguin étudié.

2.3 Pied diabétique et hyperagrégation érythrocytaire

Comme mentionnées à la section 2.2.5, l'hyperagrégation érythrocytaire est associée à des pathologies circulatoires telles que le diabète.

³ En considérant une célérité de 1540 m/s. Nous faisons référence ici à une fréquence de 35 MHz puisqu'elle correspond à la fréquence centrale maximale utilisée dans ce mémoire.

2.3.1 Diabète de type 2 et pied diabétique

Le diabète de type 2 qui survient généralement à l'âge adulte, est une maladie causée par un excès chronique de glucose dans le sang. Une personne en est atteinte lorsque son organisme ne peut plus utiliser convenablement l'insuline sécrétée par le pancréas pour réguler sa glycémie ⁴. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 150 millions de personnes dans le monde sont diabétiques, dont 90% de type 2, ce qui entraîne des conséquences socioéconomiques très importantes pour la santé publique.

L'équilibre glycémique d'un patient diabétique est généralement évalué par le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1C) (**tableau 2.3**), qui représente le pourcentage d'hémoglobine lié au glucose par rapport à la quantité totale d'hémoglobine [42, 43]. Selon la valeur de cette mesure, le diabétique se classe comme étant bien ou mal équilibré.

Tableau 2.3 : Équilibre glycémique selon le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1C)
(tiré de [43])

Taux de HbA1C	Équilibre glycémique
Entre 5.0 et 6.0 %	Individu normal
Entre 6.0 % et 7.5%	Diabétique bien équilibré
> 7.5 %	Diabétique mal équilibré

Les sujets diabétiques sont reconnus comme étant à risque pour les artériopathies des membres inférieurs (AMI). La résistance à l'insuline jouerait un rôle clef dans le développement de l'artériopathie [44]. Ainsi, la concentration de glucose anormalement élevée dans le sang contribue au développement de l'athérosclérose en augmentant l'inflammation des vaisseaux et en altérant différents tissus vasculaires, dont l'endothélium et la membrane basale des capillaires [45].

Au total, plus de 12 millions de personnes aux États-Unis seraient affectées par les AMI [46, 47]. Au Canada, les quelques études réalisées sur la population canadienne

⁴ L'insuline sert à transformer le glucose dans le sang en divers nutriments pour les cellules de l'organisme.

ont estimé qu'environ 4% de la population en serait atteinte [48]. Cette pathologie se caractérise par deux types de lésions : (1) par des dépôts de plaques lipidiques dans la paroi interne de l'artère (présence de sténose), ou (2) par de la calcification de la paroi externe de l'artère (sans présence de sténose) associée ou non à l'athérosclérose [49]. Les lésions peuvent être proximales, distales ou mixtes. L'artériopathie distale touche l'artère iliaque et les artères fémorales communes et superficielles. Les symptômes de cette artériopathie sont la claudication ⁵ et la réduction de la pulsation artérielle. L'artériopathie distale affecte les artères en bas du genou, notamment l'artère péronière, la tibiale postérieure et la tibiale antérieure. Chez les diabétiques, ce type de lésion est la plus fréquente; elle peut entraîner des troubles trophiques sévères du pied, également appelés le syndrome du pied diabétique. L'artériopathie mixte est un mélange de lésions proximales et distales.

Les AMI peuvent être classées en six (6) catégories selon Rutherford (**tableau 2.4**). Pour les catégories 5 et 6, les ulcères et les gangrènes apparaissent à cause d'une combinaison de l'AMI avec une neuropathie qui entraîne une perte de sensation du pied. Ceux-ci sont provoqués par la présence de contraintes répétitives sur certaines zones du pied lorsque le patient marche. Ainsi, le patient ne ressent pas l'effet des contraintes puisque le pied est engourdi par la neuropathie [50].

Pour traiter un pied diabétique infecté, le patient peut prendre des antibiotiques ou appliquer des crèmes sur la plaie. Si la claudication est légère, le médecin peut recommander de porter des prothèses dans les chaussures, de mettre des compresses froides, ou d'appliquer les mesures d'hygiène de bases (laver le pied, couper les ongles, etc...). Cependant, si l'artériopathie s'aggrave, le traitement peut nécessiter des interventions chirurgicales, telles les pontages et même l'amputation de la jambe. Selon les statistiques de l'*American Diabetes Association*, entre 14 à 24% des sujets diabétiques ayant une infection au pied nécessiteraient une amputation [50].

⁵ Le patient ressent de la douleur et des crampes aux niveaux des cuisses et des mollets lorsqu'il fait de l'exercice, ou dans des cas sévère, lorsqu'il est au repos.

L'index tibial-huméral (ITH), qui est le ratio de la pression systolique à la cheville sur la pression systolique au bras, est la mesure clinique la plus utilisée pour évaluer la sévérité de l'artériopathie des membres inférieurs [46]. Les valeurs normales d'ITH se situent entre 0.9 et 1.3. Un ITH inférieur à 0.8 signifie la présence d'une ou de plusieurs sténoses artérielles aux membres inférieurs, et une valeur inférieure à 0.4 signifie la présence d'une artériopathie très sévère [12].

Tableau 2.4 : Classification des artériopathies des membres inférieurs selon Rutherford
(tiré de [51])

Catégorie	Description clinique	Critères
0	Asymptomatique – aucune occlusion hémodynamique significative	<ul style="list-style-type: none"> • Tapis roulant normal ou test d'hyperémie réactive
1	Légère claudication	<ul style="list-style-type: none"> • Le patient complète l'exercice du tapis roulant • Pression à la cheville après exercice > 50 mmHg mais au moins 20 mmHg plus faible qu'au repos
2	Claudication modérée	<ul style="list-style-type: none"> • Entre les catégories 1 et 3
3	Claudication sévère	<ul style="list-style-type: none"> • Ne peut compléter l'exercice du tapis roulant • Pression à la cheville après exercice < 50 mmHg
4	Douleur ischémique au repos	<ul style="list-style-type: none"> • Pression à la cheville au repos < 40 mmHg • Pression à l'orteil < 30 mmHg
5	Perte tissulaire mineure – présence d'ulcères et de gangrène avec ischémie aux orteils	<ul style="list-style-type: none"> • Pression à la cheville au repos < 60 mmHg⁶ • Pression à l'orteil < 40 mmHg
6	Perte tissulaire majeure (s'étend à la partie transmétatarsale) – le pied ne peut être sauvé	<ul style="list-style-type: none"> • Critères de pression similaires à la catégorie 5

⁶ Dans cet article, l'auteur mentionne que la catégorie 5 possède des limites de pressions supérieures à la catégorie 4 à cause de la nécessité d'une hyperperfusion du membre afin que l'ulcère puisse guérir.

2.3.2 Hyperagrégation érythrocytaire chez les patients diabétiques

Il a été remarqué que l'hyperagrégation des globules rouges affecte les sujets diabétiques atteints d'artériopathie. De plus, les désordres hémorhéologiques jouent un rôle important dans la rétinopathie et la néphropathie qui affectent ces patients. De nombreuses études *in vitro* (basées sur la prise d'un échantillon de sang et une mesure en laboratoire) ont révélé une agrégation érythrocytaire significativement plus élevée chez les sujets diabétiques comparée aux sujets sains [52-58]. Cette élévation serait majoritairement causée par une augmentation de la concentration de fibrinogène chez le patient diabétique, mais certains auteurs ont suggéré qu'une modification de la structure du fibrinogène avait également lieu chez les diabétiques [57]. D'autres articles mentionnent que cette anomalie serait due à un taux élevé de glucose dans le sang [59]. Ainsi, des modifications au niveau de la membrane du globule rouge pourraient jouer un rôle dans cette hyperagrégation mais les études portant sur ce sujet sont contradictoires [52-54].

Concernant l'AMI qui affecte les patients diabétiques, Giansanti et al. [60] et Mantskava et al. [59] ont suggéré des désordres rhéologiques plus importants chez ceux ayant une artériopathie comparativement aux patients sans AMI. Quant à Pargalava et al. [61], ceux-ci ont révélé chez les patients diabétiques atteints d'ulcère au pied des indices d'agrégation plus élevés au niveau du pied infecté qu'au niveau du bras.

Finalement, Cloutier et al. [58] ont été les premiers à mesurer l'agrégation érythrocytaire *in vitro* chez des sujets diabétiques par des mesures ultrasonores. Dans cette publication, les cinétiques d'agrégation étaient plus élevées chez les patients diabétiques comparées aux sujets sains. Les niveaux d'agrégation stabilisés atteints pour des taux de cisaillement donnés étaient également plus importants dans le groupe diabétique de type 2 avec glycémie mal contrôlée.

En faisant la revue de la littérature sur l'hyperagrégation et la méthode ultrasonore, aucune étude n'a été réalisée pour mesurer l'agrégation *in vivo* et *in situ* chez les patients diabétiques.

2.4 Objectifs du projet

Les objectifs de ce mémoire sont de comparer l'agrégation érythrocytaire *in vivo* et *in situ* chez des sujets diabétiques atteints d'artériopathie et des sujets sains avec les ultrasons à haute fréquence. L'agrégation érythrocytaire *in vivo* estimée par des paramètres quantitatifs est comparée sur une veine de la circulation systémique (*i.e.*, au niveau du bras) et une veine de la circulation ciblée (*i.e.*, au niveau du pied). Des mesures biochimiques sanguines, des index d'agrégation *in vitro* obtenus par rétrodiffusion laser, l'index tibial-huméral, et des paramètres hémodynamiques sont également mesurés afin de valider la méthode ultrasonore. Ce projet pilote permet donc de déterminer si les ultrasons à haute fréquence peuvent caractériser l'agrégation des globules rouges *in situ*.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Sélection des patients

L'échantillon est composé d'un groupe cible et d'un groupe témoin. Pour le groupe cible, dix patients diabétiques présentant une artériopathie des membres inférieurs (3 femmes et 7 hommes, âge moyen de 53.2 ± 7.4) ont été recrutés pour ce projet. Ceux-ci ont été choisis parmi la base de données du département de radiologie du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Par la suite, chaque patient a rempli un questionnaire portant sur leurs antécédents médicaux. Six des sujets souffraient d'hypertension, six d'hyperlipidémie, un d'anémie et un autre a déjà été diagnostiqué d'un cancer. La totalité des patients avait un indice de masse corporel supérieur à 25 et quatre étaient fumeurs. Selon les critères de Rutherford [51], les patients étaient classés entre les catégories II et IV. Le **tableau 3.1** montre en détail les diagnostics cliniques pour chacun des patients diabétiques.

Le groupe témoin comprenait dix personnes appariées en âge et sexe (3 femmes et 7 hommes, âge moyen de 52.8 ± 7.2) qui devaient répondre aux critères suivants : être non fumeurs, ne pas souffrir de maladies cardiovasculaires, d'hypertension, de diabète ou d'hyperlipidémie, et ne prendre aucun médicament. Tous les sujets témoins avaient un indice de masse corporel inférieur à 25.4. Il est à noter qu'au total, douze sujets témoins avaient été choisis mais deux ont été exclus de l'étude à cause des résultats biochimiques sanguins anormalement élevés (nous avons découvert plus tard qu'un des sujets exclus était en réalité un fumeur). Pour ces deux patients exclus, une ou plusieurs des protéines inflammatoires dépassaient largement le seuil de normalité.

Les participants des deux groupes ont signé un formulaire de consentement qui a été approuvé au préalable par le comité d'éthique du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal et par celui de l'École Polytechnique de Montréal.

Tableau 3.1 : Diagnostic clinique des patients diabétiques recrutés pour ce projet

Pt	Diagnostic clinique d'artériopathie †	Classe de Rutherford	Autres diagnostics de maladies cardiovasculaires ‡	Autres diagnostics †
1	- Claudication aux 2 coins de rue - Athérome aux artères fémorales superficielles - Ischémie des membres inférieurs	III	- Hypercholestérolémie - Hypertension	- Dépression - Constipation - Douleur neuropathique
2	- Ulcère membre gauche	IV	---	---
3	- Claudication membre gauche	III	- Angine de poitrine - Hypertension - Hypercholestérolémie	- Dépression - Douleur neuropathique - Acidité estomac
4	- Vasculopathie des membres inférieurs avec ITH surestimé	III	- Hypertension - Hypercholestérolémie	- Infection fongite
5	- Claudication membre gauche - Sténose et endoprothèse	III	- MCAS - Hypertension - Hypercholestérolémie	- Douleur neuropathique
6	- Diabétique de nouveau - ITH de 0,35	III	---	- Ostéoporose - Cancer
7	- Plaie 1 ^{er} orteil gauche	IV	- Hypertension - Hypercholestérolémie	- Douleur neuropathique
8	- Claudication	II	- Hypertension - Hypercholestérolémie	- Anémie - Hypothyroïdisme - Incontinence - Hypertension pulmonaire - Asthme
9	- Claudication - Infection au pied	IV	- Hypertension - Hypercholestérolémie	- Dépression
10	- Amputation du 3 ^e orteil droit	V	- Hypercholestérolémie	---

† Informations tirées à partir du rapport de radiologie

£ Informations tirées à partir de la liste des prescriptions du patient

Pt : Patient

ITH : index tibial-huméral

MCAS : maladie cardiaque athérosclérotique

3.2 Méthodes de collecte de données

Pour ce projet, chaque patient a été soumis à une prise de sang à jeun et un examen échographique vasculaire. Les échantillons de sang obtenus ont servi à l'analyse biochimique et à la quantification *in vitro* de l'agrégation des globules rouges. Ensuite, l'examen échographique vasculaire a été divisé en deux étapes : (1) un pré-examen qui a permis d'obtenir l'index tibial-huméral, la localisation des vaisseaux et des mesures de vitesse Doppler, et (2) un examen portant sur les mesures d'agrégation érythrocytaire.

3.3 Analyse sanguine

3.3.1 Analyse biochimique

Environ 30 mL de sang ont été recueillis dans des tubes standards sous vide pour analyser les constituants suivants :

- (1) le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1C),
- (2) les triglycérides (Tri),
- (3) le taux de cholestérol total (Chol),
- (4) le taux de lipoprotéines à haute densité (HDL),
- (5) le taux de lipoprotéines à basse densité (LDL),
- (6) la concentration plasmatique de fibrinogène (Fb),
- (7) la concentration plasmatique d'immunoglobuline G (IgG),
- (8) la concentration plasmatique d'haptoglobine (Hp), et
- (9) la concentration plasmatique de protéine C réactive (CRP).

Le HbA1C qui permet d'évaluer l'équilibre glycémique du patient a été quantifié par chromatographie liquide à haute performance. Pour le bilan lipidique, des méthodes enzymatiques standards ont été utilisées pour déterminer la concentration de Trig et de Chol. Le taux de HDL a été évalué par précipitation de l'apolipoprotéine-B avec du sulfate de Dextran / $MgCl_2$, et celui du LDL, par la formule standard de Friedewald [62]. Pour analyser les protéines inflammatoires présentes dans le plasma sanguin et pouvant expliquer des niveaux élevés d'agrégation érythrocytaire, la concentration de Fb a été mesurée par la méthode de Von Clauss (dosage chromométrique du temps de thrombine), celles du IgG et Hp, par immunonéphélométrie, et celle du CRP par agglutination de latex.

3.3.2 Mesures d'agrégation in vitro avec l'agrégamètre laser

Environ 5 mL de sang ont été recueillis dans des tubes anticoagulés avec de l'EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) afin de mesurer des indices d'agrégation *in vitro*. La méthode standard pour quantifier l'agrégation des globules rouges *in vitro* est l'érythro-agrégamètre laser (modèle Regulest, France). Une première séquence de mesure a été réalisée sur du sang au taux d'hématocrite systémique, et une deuxième, avec l'hématocrite ajusté à 40 %, toutes deux effectuées à une température de 37 °C. L'ajout de la mesure à 40% d'hématocrite vise à respecter des protocoles standardisés tel que réalisé dans plusieurs études [52, 55, 56, 63]. Ainsi, un hématocrite standard permet d'optimiser la reproductibilité de la technique optique [64].

L'érythro-agrégamètre laser est basé sur la rétrodiffusion de la lumière : un faisceau laser est envoyé et celui-ci est rétrodiffusé par les agrégats de globules rouges. Contrairement aux ultrasons, l'intensité est maximale quand les érythrocytes sont désagrégés : ils sont alors désorientés et provoquent une diffusion isotrope de la lumière. La diffusion est minimale lorsqu'il y a agrégation sous forme de rouleaux ordonnés.

Cet instrument utilise un écoulement de type Couette, qui consiste en deux cylindres concentriques, l'un rotatif et l'autre fixe. Avec une telle géométrie, ce type

d'écoulement permet de générer un taux de cisaillement homogène dans l'entrefer des deux cylindres. Les index d'agrégation obtenus avec l'érythro-agrégamètre sont calculés à partir de la courbe de l'intensité rétrodiffusée en fonction du temps pour deux cinétiques d'agrégation différentes.

La première cinétique consiste à appliquer un taux de cisaillement très élevé (550 s^{-1}) pendant 10 secondes et à arrêter le flot brusquement (0 s^{-1}). La deuxième cinétique est obtenue en augmentant graduellement le taux de cisaillement à partir d'une valeur initiale de 6 s^{-1} jusqu'à une valeur de 720 s^{-1} . Ainsi, la première cinétique permet de déterminer le temps d'agrégation (t_A), le temps d'agrégation final (t_F) et l'indice cinétique moyen après 10 secondes d'arrêt (S_{10}). La deuxième cinétique quant à elle, sert à obtenir les taux de dissociation partiel (γ_S) et total (γ_D) des agrégats.

Les temps d'agrégation permettent de déterminer si les rouleaux se forment rapidement ou non : t_A est obtenu par l'inverse de la pente de la courbe de diffusion de la lumière entre 0.5 et 2.0 secondes, et t_F est le temps correspondant à une variation non significative de cette courbe. S_{10} est obtenu en intégrant l'intensité rétrodiffusée entre 0 et 10 secondes, et finalement, γ_S et γ_D sont les taux de cisaillements nécessaires pour désagréger les rouleaux.

3.4. Examen échographique vasculaire

Pour chaque patient, l'examen échographique vasculaire a été réalisé en deux étapes, soit (1) un pré-examen effectué avec un échographe duplex clinique (modèle ATL 5000 HDI, Philips, MA, USA), et (2) un examen portant sur l'agrégation des globules rouges avec un échographe de recherche à haute résolution (modèle Vevo 770, Visualsonics, Toronto, Canada). Durant tout l'examen échographique, le patient était en position dorsale. Un gel a été appliqué sur la peau du patient afin de permettre la propagation des ondes ultrasonores.

3.4.1 Pré-examen

Le pré-examen a été effectué en duplex scan avec deux sondes multilinéaires, l'une ayant une fréquence centrale de 12 MHz (L12-5-38), et l'autre ayant une fréquence centrale de 7 MHz (L7-4). En mode Doppler, la sonde de 12 MHz transmet à 6 MHz alors que celle de 7 MHz transmet à 4 MHz. Pour chaque patient, le choix de la sonde dépendait de la profondeur des vaisseaux recherchés. En mode Doppler, un angle proche de 60° a été utilisé. La fréquence de répétition de chaque excitation du capteur ultrasonore (« pulse repetition frequency ») et le volume d'échantillonnage ont été optimisés pour chaque vaisseau. Dans tous les cas, le filtre de paroi (« wall filter ») qui permet d'éliminer les artefacts de vibrations de la paroi vasculaire sur le tracé Doppler a été fixé au minimum (« low »).

Ce pré-examen avait pour objectif (1) de calculer l'index tibial-huméral du patient, (2) de localiser les vaisseaux, et (3) d'obtenir les spectres Doppler pour calculer les paramètres hémodynamiques nécessaires à l'interprétation de nos résultats d'agrégation érythrocytaire.

3.4.1.1 Calculs de l'index tibial huméral

Comme mentionné à la section 2.3.1 de l'introduction, l'index tibial huméral (ITH) se calcule en faisant le rapport de la pression systolique de la cheville sur celle du bras. Les mesures de ces pressions ont été obtenues par échographie duplex scan couplée avec un brassard gonflable par la technique suivante : tout d'abord, le brassard est placé autour de la cheville et la sonde est posée sur l'artère tibiale postérieure. En gonflant le brassard, la circulation sanguine dans le vaisseau est arrêtée partiellement. Ensuite, le brassard se dégonfle peu à peu et la pression systolique de l'artère est notée au moment où l'écoulement sanguin recommence à circuler. La même technique a été appliquée pour mesurer la pression systolique du bras dont le vaisseau d'intérêt était l'artère humérale.

3.4.1.2 Localisation des artères et veines

Les vaisseaux suivants ont été imagés pour chaque patient: au bras, (a) la veine céphalique (CEP) et (b) l'artère humérale (HUM), et au pied, (c) la veine saphène interne (SAI) et (d) l'artère pédieuse superficielle (PED) (voir figure 3.1). Pour les veines CEP et SAI, une marque rouge a été laissée sur la peau du patient afin de faciliter leur repérage lors des mesures d'agrégation avec l'échographe de recherche (section 3.4.2). Chez certains patients, des substitutions ont été effectuées puisque le vaisseau en question était inexistant ou trop petit. Pour deux patients, la veine CEP a été remplacée par la veine basilique. De plus, la veine SAI a été substituée par la veine tibiale postérieure pour un patient, et l'artère PED a été remplacée par l'artère tibiale postérieure pour un autre patient. Afin de faciliter les notations dans ce rapport, nous garderons les appellations suivantes pour tous les individus étudiés : CEP pour la veine du bras, HUM pour l'artère du bras, SAI pour la veine du pied, et PED pour l'artère du pied.

Pour les sujets sains, les quatre vaisseaux ont été localisés sur le côté droit des membres. Pour les patients diabétiques, la veine CEP et l'artère HUM ont été localisées sur le bras droit alors que la veine SAI et l'artère PED ont été étudiées sur le côté du membre claudicant le plus sévère. Il est à noter que la circulation sanguine au niveau du bras sert de référence dans cette étude pour décrire la circulation systémique alors que celle du pied constitue la zone de référence décrivant la circulation locale du pied (pied diabétique pour le groupe cible).

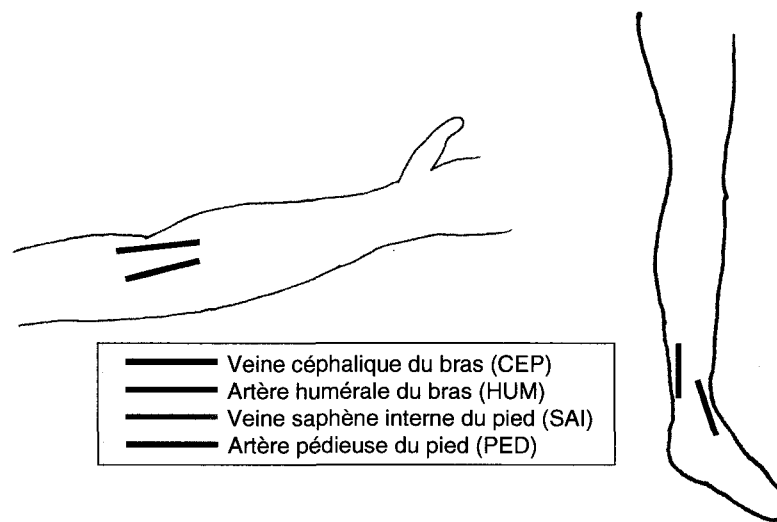


Figure 3.1 : Localisation approximative des vaisseaux sanguins imagés

3.4.1.3 Mesures des paramètres hémodynamiques

Des paramètres hémodynamiques artériels et veineux ont été calculés à partir du mode Doppler et des images mode B. Pour les veines CEP et SAI, le diamètre (D_i), la vitesse moyenne (V_{moy}) et le taux de cisaillement moyen ($\bar{\gamma}$) ont été estimés. D_i est mesuré à partir de l'image mode B de l'échographe Visualsonics, et V_{moy} est obtenue par l'équation suivante :

$$V_{moy} = \frac{\int_0^t V_{centre} dt}{\Delta t}, \quad (eqn 3.1)$$

où V_{centre} est la vitesse au centre du vaisseau mesurée à partir du spectre Doppler, t , le temps, et Δt , l'intervalle de temps entre le début et la fin de l'acquisition (environ 5 secondes). La figure 3.2 illustre un exemple de V_{centre} en fonction de t pour la veine céphalique du bras.



Figure 3.2 : Vitesse au centre du vaisseau en fonction du temps dans une veine céphalique

Quant à \bar{v} , celui-ci a été calculé selon la formule suivante [65] :

$$\bar{v} = \frac{2V_{moy}}{r} \left(\frac{n}{n+1} \right), \quad (eqn. 3.2)$$

où r est le rayon du vaisseau, et n , une constante reliée au profil de vitesse de l'écoulement. Dans le cadre de ce projet, la forme du profil de vitesse et sa dépendance temporelle n'ont pu être mesurés avec l'instrumentation disponible et nous supposons un profil parabolique ($n = 2$). Le peu de pulsatilité dans le réseau veineux permet une telle supposition (écoulement de Poiseuille).

Pour les artères PED et HUM, les paramètres hémodynamiques suivants ont été calculés : D_i , V_{moy} , la vitesse maximale systolique (V_{max_syst}), l'index de résistivité (RI) et l'index de pulsatilité (PI). D_i et V_{moy} pour les artères ont été obtenus de la même façon que pour les veines, et V_{max_syst} , RI et PI ont été calculées à partir du spectre Doppler (voir l'**annexe B** pour les calculs de RI et PI qui dépendent de la mesure V_{max_syst} définie comme le paramètre A dans cet annexe).

Pour les vitesses très basses dans les veines (< 0.6 cm/s), la sonde Doppler L12-5-38 qui transmet à 6 MHz n'a pas été en mesure de les détecter à cause des filtres de paroi passe-haut de l'échographe. Puisqu'une vitesse nulle est peu probable, nous avons supposé une vitesse moyenne $V_{moy} = 0,6$ cm/s pour toute vitesse non détectée par la sonde Doppler, ce qui correspond à la limite inférieure pouvant être détectée à 6 MHz selon la littérature [66].

3.4.2 Mesures d'agrégation ultrasonores *in vivo*

Suite au pré-examen vasculaire, l'investigation portant sur l'agrégation des globules rouges *in vivo* dans les veines CEP et SAI a été réalisée avec l'échographe à haute résolution. Le système ultrasonore de recherche Visualsonics, approuvé pour l'imagerie des petits animaux, a obtenu une accréditation spéciale de Santé Canada pour son utilisation dans ce projet clinique. Les sondes de cet appareil consistent en un transducteur mono-élément focalisé à balayage linéaire. Celles utilisées pour ce projet possèdent une fréquence centrale de 25 MHz (RMS-710, distance focale de 15 mm) et de 35 MHz (RMS-703, distance focale de 10 mm). La vitesse de balayage de la sonde a été fixée à 20 Hz et la taille des images était de 18 mm×18 mm. Il est à noter que les mesures d'agrégation *in vivo* ont été réalisées sur les veines seulement puisque les signaux de radio-fréquence nécessaires pour estimer la taille des agrégats étaient trop atténués dans les artères à cause de leur profondeur.

Pour chaque veine, cinq séries d'acquisitions ont été prises, où chaque série consistait en 5 images, ce qui donne un total de 25 images RF par vaisseau (voir **figure 3.3 à la fin de la section 3.4.3**). Puisque la distance focale des sondes de l'appareil Visualsonics est fixe, des minces couches d'agar d'épaisseurs différentes ont été appliquées sur la peau du patient afin de placer le centre du vaisseau dans la zone focale du transducteur (mélange de 3 g d'agar, Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA, dans une solution de 8 mL de glycérol et de 100 mL d'eau distillée).

Afin de visualiser les signaux RF lors de l'acquisition, un émetteur-récepteur Panametrics (modèle 5900 PR, Waltham, MA, USA) servant à amplifier et à filtrer les échos, et un oscilloscope numérique de 8 bits (Gagescope, modèle 8500CS, Montréal, Québec, CANADA) ont été branchés à l'échographe. Les signaux RF ont été enregistrés pour le sang circulant dans les vaisseaux et pour une solution sanguine à 6 % d'hématocrite (H6) à une fréquence d'échantillonnage de 500 MHz. La solution H6, qui consistait en un échantillon de globules rouges suspendus dans une solution saline, a servi de référence pour la procédure de normalisation des signaux décrite à la section 3.4.3. Cet échantillon a été placé dans un bécher et a été mélangé uniformément grâce à un agitateur magnétique. Pour chaque série d'acquisitions, 3500 lignes RF (équivalent de 5 images par acquisition) ont été enregistrées. Ce nombre d'images est identique à celui des acquisitions veineuses *in vivo*.

3.4.3 Calcul des paramètres d'agrégation *in vivo*

Afin d'obtenir des valeurs d'agrégation entre les deux populations, des paramètres quantitatifs ont été calculés à partir d'un estimateur de taille et d'atténuation par le facteur de structure (SFSAE, Structure Factor Size and Attenuation Estimator) [67]. Trois paramètres calculés ont été obtenus simultanément à partir d'une minimisation par moindres carrés entre deux valeurs BSC_{exp} et BSC_{theo} , soit D , qui représente le diamètre isotrope d'un agrégat⁷, W , qui représente le facteur de corrélation spatiale des agrégats, et α , le coefficient d'atténuation de la peau exprimé en dB/MHz (eqn 3.3).

$$F(D, W, \alpha) = \|BSC_{exp} - BSC_{theo}\|^2 \quad (eqn 3.3)$$

Le coefficient de rétrodiffusion théorique du sang (BSC_{theo}) se base sur l'approximation de Born compensée en atténuation et se calcule par :

⁷ D est un paramètre relié à la taille des agrégats de globules rouges.

$$BSC_{theo}(k) = m\sigma_b(k)S(k)A(k) \quad (eqn 3.4)$$

où m représente la densité en nombre des diffuseurs, σ_b , la rétrodiffusion transversale d'un seul globule rouge, $S(k)$, le facteur de structure, et $A(k)$ l'atténuation.

Le premier terme de l'eqn 3.4, soit la densité des diffuseurs (m), se calcule par

$$m = \frac{H}{V_s} \quad (eqn 3.5)$$

avec H , l'hématocrite et V_s , le volume d'un globule rouge. La première mesure est obtenue expérimentalement par centrifugation à l'aide de l'échantillon de sang recueilli tandis que V_s peut être approximé par $87 \mu\text{m}^3$ tel qu'utilisé dans [68].

Le deuxième terme de l'eqn 3.4 qui représente la rétrodiffusion transversale d'un seul globule rouge (σ_b) se calcule par

$$\sigma_b(k) = \frac{1}{4\pi^2} V_s \gamma_z^2 k^4 \left(3 \frac{\sin(2ka) - 2ka \cos(2ka)}{(2ka)^3} \right)^2 \quad (eqn 3.6)$$

avec γ_z , k et a étant respectivement l'impédance acoustique relative du sang⁸, le nombre d'onde⁹ et le rayon moyen d'un érythrocyte, en supposant ce diffuseur de forme sphérique.

Quant au troisième terme de l'eqn 3.4, soit le facteur de structure $S(k)$, celui-ci est fonction de la transformée de Fourier de $g(r)$ qui représente la probabilité de trouver deux particules séparées d'une distance r .

$$S(k) = 1 + m \int (g(r) - 1) e^{-2jkr} dr \quad (eqn 3.7)$$

⁸ L'impédance acoustique relative du sang γ_z se calcule par $(Z_{\text{sang}} - Z_{\text{plasma}}) / Z_{\text{plasma}}$, où Z est l'impédance acoustique du milieu. $Z_{\text{sang}} = 1.755 \times 10^6 \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et $Z_{\text{plasma}} = 1.580 \times 10^6 \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ce qui donne $\gamma_z = 0.11$ [69]

⁹ Le nombre d'onde se calcule par $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, où λ est la longueur d'onde exprimée comme étant $\lambda = \frac{c}{f}$, avec c , la vitesse du son (1540 m/s) et f , la fréquence.

En utilisant un développement de Taylor de deuxième ordre, cette dernière équation peut être approximée par (voir **annexe C**)

$$S(k) \approx W - \frac{12}{5}(kR)^2 \quad (\text{eqn 3.8})$$

où R est la taille moyenne des agrégats considérés isotropes. Les valeurs de W et R constituent des paramètres à estimer du modèle.

Finalement, le quatrième terme de l'eqn 3.3 qui correspond à l'atténuation de la peau $A(k)$ se calcule par

$$A(k) = e^{-4\alpha \times f} \quad (\text{eqn 3.9})$$

où α représente une sommation de α_i et d_i (eqn 3.10) qui représentent respectivement l'atténuation en dB/MHz/cm et l'épaisseur des différentes couches de tissus affectant la mesure de la rétrodiffusion sanguine, comme celle de la peau, de la couche adipeuse et du sang. Une dépendance linéaire en fonction de la fréquence est supposée dans ce travail.

Le coefficient d'atténuation est donné par

$$\alpha = \sum_i \alpha_i \times d_i \quad (\text{eqn 3.10})$$

Il constitue le dernier paramètre à estimer du modèle.

En remplaçant les quatre termes de l'eqn 3.4 par leur équivalent respectif (eqns 3.5, 3.6, 3.8 et 3.9), nous obtenons le coefficient de rétrodiffusion théorique (BSC_{theo}).

$$BSC_{theo}(k) = \frac{1}{3\pi} H\gamma_Z^2 k^4 a^3 \left(3 \frac{\sin(2ka) - 2ka \cos(2ka)}{(2ka)^3} \right)^2 \left(W - \frac{12}{5}(kR)^2 \right) \times \exp(-4\alpha \times f) \quad (\text{eqn 3.11})$$

où W , R et α sont les inconnus.

La suite de la présente section vise à obtenir le coefficient de rétrodiffusion expérimental (BSC_{exp}) qui est obtenu en tenant compte du facteur de normalisation BSC_{H6} comme suit :

$$BSC_{exp} = BSC_{H6} \times \frac{S_{sang}}{S_{H6}} \quad (\text{eqn 3.12})$$

où

$$BSC_{H6} = \frac{1}{3\pi} H\gamma_z^2 k^4 a^3 \left(3 \frac{\sin(2ka) - 2ka \cos(2ka)}{(2ka)^3} \right)^2 W \quad (\text{eqn. 3.13})^{10}$$

Aux équations 3.12 et 3.13, BSC_{H6} est le coefficient de rétrodiffusion de la suspension H6 mesuré dans un bécher. S_{sang} et S_{H6} sont les densités spectrales de puissance du signal rétrodiffusé par le sang dans le vaisseau sanguin et par la suspension H6. Ceux-ci ont été obtenus à partir de la transformée de Fourier des signaux RF du milieu respectif.

En résumé, la méthode de minimisation SFSAE permet donc d'évaluer simultanément les paramètres D (où $D = R/a$), W (sans unité) et α (en dB/MHz/cm) en considérant l'eqn 3.3. Pour les veines CEP et SAI, ces paramètres ont été calculés sur trois régions d'intérêt (ROI) de 60 μm de largeur et de hauteurs variables, dépendamment du diamètre du vaisseau. Ainsi, l'utilisation de trois ROI sert à éliminer l'effet des changements locaux d'échogénicité qui pourraient avoir lieu dans une veine. Pour D et W , les mesures ont été moyennés sur les trois ROI, alors que α a été calculée pour chacune des ROI (l'épaisseur de la peau pouvait varier d'une ROI à une autre). La **figure 3.3** schématise les étapes utilisées pour calculer D , W et α .

¹⁰ Pour le cas du H6, $W_{H6} = \frac{(1 - H_6)^4}{(1 + 2H_6)^2}$ [69]

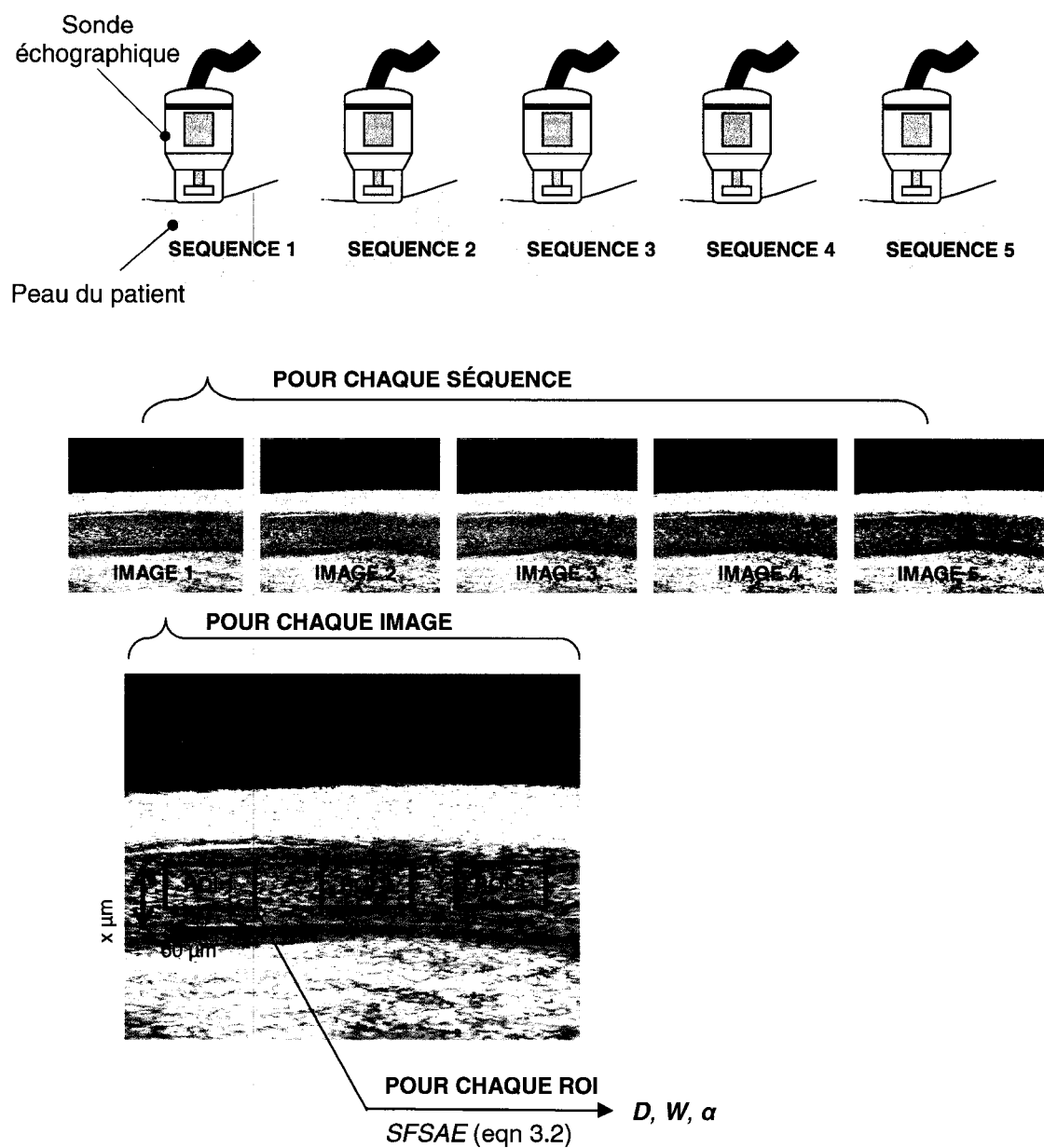


Figure 3.3 : Étapes utilisées pour calculer D , W et α dans les veines céphalique et saphène interne

3.5 Analyses statistiques

Des tests de Student non pairés ont été utilisés pour comparer les données biochimiques sanguines, les indices d'agrégation *in vitro*, et l'ITH entre les sujets sains et les patients diabétiques. Des tests de U Mann-Whitney ont été choisis pour comparer les données hémodynamiques et les paramètres d'agrégation *in vivo* entre les deux groupes de patients. Des tests non-paramétriques ont été utilisés dans ces cas-ci puisque les données *in vivo* comportaient de très grandes variabilités pour un petit échantillon. Par conséquent, une distribution normale ne pouvait être considérée pour ces mesures.

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne \pm 1 écart-type. La médiane, le minimum et le maximum ont été calculés pour les données hémodynamiques, alors que la médiane, les percentiles à 25 % et à 75 % sont rapportés pour les paramètres d'agrégation *in vivo*. Les percentiles ont été calculés pour ces derniers afin de présenter ces résultats sous forme graphique.

Une différence a été considérée significative lorsque $p < 0.05$. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Sigma Stat version 3.0 (San Rafael, CA, USA).

4. RÉSULTATS

4.1 Données physiologiques

Les paramètres physiologiques pour le groupe de référence et le groupe cible sont montrés au **tableau 4.1**.

Tableau 4.1 : Paramètres physiologiques mesurés pour les sujets normaux et diabétiques atteints d'artériopathie des membres inférieurs

Paramètres physiologiques	Sujets témoins (N=10)	Sujets diabétiques (N=10)
Âge (années)	53,8 ± 7,0	53,2 ± 7,4
IMC (kg/m ²)	23,6 ± 1,8	32,5 ± 5,1***
Hématocrite (%)	44,3 ± 3,5	42,0 ± 4,5
HbA1C (%)	0,055 ± 0,001 [†]	0,078 ± 0,012***
Trig (mmol/L)	1,18 ± 0,37	1,68 ± 0,63*
Chol (mmol/L)	5,49 ± 0,94	4,32 ± 1,01*
HDL (mmol/L)	1,59 ± 0,27	1,17 ± 0,30**
LDL (mmol/L)	3,35 ± 0,87	2,39 ± 0,64*
Fb (g/L)	2,54 ± 0,27	3,37 ± 0,54***
IgG (g/L)	9,94 ± 2,49	10,69 ± 2,56
Hp (g/L)	1,17 ± 0,31	2,45 ± 0,63***
CRP (mg/L)	1,60 ± 0,99	17,08 ± 38,41**
ITH (pas d'unité)	1,14 ± 0,10	0,91 ± 0,12***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (tests de Student non-pairés)

[†] N=9

IMC : indice de masse corporelle; HbA1C : hémoglobine glyquée; Trig : concentration de triglycérides; Chol : concentration de cholestérol total; HDL : concentration de lipoprotéines à haute densité; LDL : concentration de lipoprotéines à faible densité; IgG : concentration d'immunoglobuline G plasmatique; Hp : concentration d'haptoglobine plasmatique; CRP : concentration de protéine C-réactive plasmatique; ITH : index tibial-huméral;

Tel que montré à ce tableau, l'IMC ($p < 0,001$), l'HbA1C ($p < 0,001$), les Trig ($p = 0,05$), le HDL ($p = 0,004$), le Fb ($p < 0,001$), l'Hp ($p < 0,001$), le CRP ($p = 0,002$) et l'ITH ($p < 0,001$) sont significativement différents entre les groupes témoins et diabétiques. Étonnamment, le Chol ($p = 0,016$) et le LDL ($p = 0,011$) sont plus faibles chez les diabétiques que chez les témoins. Cet aspect sera élaboré en discussion.

4.2 Indices d'agrégation *in vitro*

Pour les deux groupes d'individus, les index d'agrégation *in vitro* mesurés avec l'érythro-agrégamètre laser sont montrés au **tableau 4.2** pour l'hématocrite ajusté à 40 %, et au **tableau 4.3** pour l'hématocrite non ajusté.

Tableau 4.2 : Index d'agrégation *in vitro* mesurés avec l'érythro-agrégamètre laser à un hématocrite de 40 % pour les sujets témoins et diabétiques

Index d'agrégation	Sujets témoins (N=10)	Sujets diabétiques (N=10)
t_A (s)	$2,53 \pm 0,61$	$1,84 \pm 0,29^{**}$
t_F (s)	$22,36 \pm 6,07$	$12,92 \pm 3,20^{***}$
S_{10} (sans unité)	$24,07 \pm 3,74$	$29,32 \pm 4,04^{**}$
γ_D (s^{-1})	$55,82 \pm 15,98$	$63,48 \pm 14,52$
γ_S (s^{-1})	$148,5 \pm 35,98$	$186,5 \pm 58,36$ ($p = 0,097$)

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (tests de Student non-pairés)

t_A : temps d'agrégation; t_F : temps d'agrégation final, S_{10} : indice cinétique moyen après 10 s; γ_D : seuil de dissociation partiel; γ_S : seuil de dissociation total.

Tableau 4.3 : Index d'agrégation *in vitro* mesurés avec l'érythro-agrégamètre laser à un hémocrite non ajusté pour les sujets témoins et diabétiques

Indices d'agrégation	Sujets témoins (N=10)	Sujets diabétiques (N=9) [†]
t _A (s)	2,56 ± 0,72	1,87 ± 0,32*
t _F (s)	23,85 ± 7,31	13,89 ± 3,41**
S ₁₀ (sans unité)	24,62 ± 4,74	28,83 ± 5,09 (<i>p</i> = 0,079)
γ _D (s ⁻¹)	42,98 ± 11,82	57,82 ± 11,52***
γ _S (s ⁻¹)	92,5 ± 14,56	156,11 ± 37,06*

* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01 *** *p* < 0,001 (tests de Student non-pairés)

[†] N=9

t_A : temps d'agrégation; t_F : temps d'agrégation final, S₁₀ : indice cinétique moyen après 10 s; γ_D : seuil de dissociation partiel; γ_S : seuil de dissociation total.

Selon le **tableau 4.2**, les index d'agrégation par rétrodiffusion laser pour le sang ajusté à un hémocrite de 40% diffèrent significativement entre les deux populations pour les paramètres t_A (*p* = 0,003), t_F (*p* < 0,001) et S₁₀ (*p* = 0,007). γ_D et γ_S sont également plus élevés pour les sujets diabétiques sans y être significativement différents (*p* = 0,276 et *p* = 0,097, respectivement). Le **tableau 4.3** indique les index obtenus avec l'hémocrite non ajusté. Dans ce cas, les paramètres t_A (*p* = 0,013), t_F (*p* = 0,002), γ_D (*p* = 0,013) et γ_S (*p* < 0,001) sont statistiquement différents entre les deux groupes. De plus, S₁₀ est plus élevé chez les sujets diabétiques sans être statistiquement supérieur (*p* = 0,079). Que ce soit à un hémocrite ajusté ou non, ces résultats confirment des niveaux supérieurs d'agrégabilité érythrocytaire pour le groupe cible. Nous utilisons ici le terme agrégabilité pour décrire la tendance accrue à former des agrégats et à résister aux forces de cisaillement. Les paramètres des **tableaux 4.2** et **4.3** ne décrivent pas l'agrégation en termes de taille ou de structure.

4.3 Données hémodynamiques

Les **tableaux 4.4** et **4.5** montrent les paramètres hémodynamiques artériels et veineux calculés pour les sujets témoins et diabétiques. Les paramètres veineux (**tableau 4.4**) confirment l'existence de vitesses moyennes (V_{moy_i}) et de taux de cisaillement ($\bar{\gamma}_i$) statistiquement plus élevés chez les diabétiques pour les deux types de veines ($p = 0,054$ pour $V_{\text{moy_CEP}}$, $p = 0,011$ pour $V_{\text{moy_SAI}}$, et $p = 0,009$ pour $\bar{\gamma}_{\text{CEP}}$ et $\bar{\gamma}_{\text{SAI}}$). Pour les paramètres artériels (**tableau 4.5**), nous observons au niveau de l'artère pédieuse (PED), des différences significatives pour la vitesse moyenne ($V_{\text{moy_PED}}$) ($p = 0,01$), l'index de résistivité (RI_{PED}) ($p = 0,03$) et l'index de pulsativité (PI_{PED}) ($p = 0,003$). Aucune différence statistique entre les deux groupes n'a été relevée pour les diamètres des vaisseaux (D_i) ($p > 0,273$) et les vitesses maximales systoliques ($V_{\text{max_syst}_i}$) ($p > 0,438$).

Tableau 4.4 : Paramètres hémodynamiques veineux calculés pour les sujets témoins et diabétiques

Paramètres calculés	Sujets témoins (N=10)	Sujets diabétiques (N=10)
D_{CEP} (mm)	$4,38 \pm 0,93$ (méd = 4,12; min = 3,30; max = 6,24)	$3,71 \pm 1,11$ (méd = 3,69; min = 2,10; max = 6,24)
D_{SAI} (mm)	$2,42 \pm 0,63$ (méd = 2,23; min = 1,53; max = 3,29)	$2,33 \pm 0,53$ (méd = 2,41; min = 1,74; max = 3,21)
$V_{\text{moy_CEP}}$ (cm / s)	$4,16 \pm 3,95$ (méd = 2,84; min = 0,60; max = 11,60)	$9,17 \pm 7,47$ ($p = 0,054$) (méd = 6,51; min = 2,15; max = 25,44)
$V_{\text{moy_SAI}}$ (cm / s)	$1,72 \pm 1,71$ (méd = 1,11; min = 0,60; max = 6,12)	$4,66 \pm 2,39$ * (méd = 4,98; min = 0,73; max = 8)
$\bar{\gamma}_{\text{CEP}}$ (s^{-1})	$24,8 \pm 24,5$ (méd = 20,0; min = 4,0; max = 70,0)	$69,3 \pm 64,6$ ** (méd = 46,5; min = 23,0; max = 230,0)
$\bar{\gamma}_{\text{SAI}}$ (s^{-1})	$21,6 \pm 26,6$ (méd = 10,5; min = 5,0; max = 91,0)	$51,7 \pm 29,6$ ** (méd = 51,0; min = 8,0; max = 109,0)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (tests de U Mann-Whitney)

méd: médiane; min: minimum; max: maximum

CEP: veine céphalique (bras); SAI: veine saphène interne (pied); D_i : diamètre du vaisseau i ; V_{moy_i} : vitesse moyenne du vaisseau i ; $\bar{\gamma}_i$: taux de cisaillement de la veine i .

Tableau 4.5 : Paramètres hémodynamiques artériels calculés pour les sujets témoins et diabétiques

Paramètres calculés	Sujets témoins (N=10)	Sujets diabétiques (N=10 ou N=9 [†])
D _{HUM} (mm)	4,49 ± 0,66 (méd = 4,43; min = 3,33; max = 5,44)	4,54 ± 0,98 (méd = 4,57; min = 2,97; max = 6,09)
D _{PED} (mm)	2,07 ± 0,48 (méd = 1,99; min = 1,39; max = 6,12)	2,30 ± 0,94 (méd = 2,47; min = 0,88; max = 3,54)
V _{max_syst_HUM} (cm / s)	76,5 ± 15,8 (méd = 77,2; min = 39,4; max = 92,9)	80,9 ± 26,7 [†] (méd = 96,9; min = 35,8; max = 114,5)
V _{max_syst_PED} (cm / s)	57,1 ± 16,3 (méd = 54,6; min = 37,6; max = 96,0)	59,3 ± 31,1 [†] (méd = 58,2; min = 16,0; max = 110,4)
V _{moy_HUM} (cm / s)	11,9 ± 4,7 (méd = 12,6; min = 4,6; max = 19,2)	15,3 ± 5,5 [†] (méd = 15,1; min = 6,4; max = 23,7)
V _{moy_PED} (cm / s)	4,7 ± 2,4 (méd = 4,0; min = 1,4; max = 9,7)	13,8 ± 10,5* (méd = 12,4; min = 2,1; max = 37,9)
RI _{HUM} (sans unité)	0,99 ± 0,03 (méd = 1,00; min = 0,91; max = 1,00)	0,97 ± 0,05 [†] (méd = 1,00; min = 0,88; max = 1,00)
RI _{PED} (sans unité)	1,00 ± 0,01 (méd = 1,00; min = 0,99; max = 1,03)	0,90 ± 0,10 [†] * (méd = 0,88; min = 0,78; max = 1,00)
PI _{HUM} (sans unité)	8,38 ± 2,88 (méd = 7,65; min = 4,08; max = 12,24)	6,84 ± 2,57 [†] (méd = 7,20; min = 3,55; max = 11,64)
PI _{PED} (sans unité)	20,52 ± 14,95 (méd = 14,70; min = 10,88; max = 57,67)	6,82 ± 5,37 [†] * (méd = 3,62; min = 1,29; max = 16,62)

* $p < 0,05$, (test de U Mann-Whitney)

[†] N=9

méd : médiane; min : minimum; max : maximum

HUM : artère humérale (bras); PED : artère pédieuse (pied); D_i : diamètre du vaisseau *i*, V_{moy_i} : vitesse moyenne du vaisseau *i*, V_{max_syst_i} : vitesse maximale systolique de l'artère *i*; RI_i : index de résistivité de l'artère *i*, PI_i : index de pulsativité de l'artère *i*.

4.4 Échogénicité sanguine *in vivo*

4.4.1 Paramètres d'agrégation *in vivo*

À partir de l'équation 3.3, les paramètres d'agrégation *in vivo* D et W ont été calculés pour les deux veines, soit la veine céphalique (CEP) et la veine saphène interne (SAI), et ce avec les sondes de 25 MHz et 35 MHz.

Puisque D et W ne peuvent être analysés sans tenir compte du taux de cisaillement (γ) dans le vaisseau, nous avons créé des variables $D.\gamma$ et $W.\gamma$. D et W reflètent l'agrégation *in vivo* tandis que $D.\gamma$ et $W.\gamma$ mesurent l'agrégabilité. En émettant comme hypothèse que la taille des agrégats suit une loi inverse proportionnelle en fonction du taux de cisaillement [14, 70], nous supposons que D en fonction de γ s'exprime comme étant $D = C / \gamma$ où C représente une constante. Ainsi, c'est la constante $C = D.\gamma$ qui permet la comparaison entre les populations diabétiques et témoins pour ce qui a trait à la tendance des agrégats à résister aux forces de cisaillement. Le même principe s'applique pour le paramètre $W.\gamma$.

Les **figures 4.1** et **4.2** montrent respectivement $D.\gamma$ pour la veine CEP et la veine SAI à 25 MHz pour chacune des populations, et $W.\gamma$ pour les mêmes vaisseaux. Les **figures 4.3** et **4.4** illustrent les mêmes paramètres avec la sonde de 35 MHz.

À 25 MHz, $D.\gamma$ (**figure 4.1**) et $W.\gamma$ (**figure 4.2**) sont statistiquement plus élevés chez les diabétiques pour les deux veines ($p < 0,021$), et ne diffèrent pas entre les deux veines pour un même groupe d'individus ($p > 0,186$). Les mêmes tendances s'observent à 35 MHz : la différence entre les deux populations pour $D.\gamma$ est significative pour la veine CEP ($p < 0,021$, **figure 4.3**) mais non significative pour la veine SAI ($p = 0,07$, **figure 4.3**). Pour $W.\gamma$ il est plus élevé chez les diabétiques pour les deux vaisseaux ($p < 0,026$, **figure 4.4**). Comme à 25 MHz, $D.\gamma$ et $W.\gamma$ à 35 MHz ne diffèrent pas entre les deux

vaisseaux pour une même catégorie de sujets ($p > 0,57$). Cependant, nous observons que les paramètres $D.\gamma$ et $W.\gamma$ sont moins élevés à 35 MHz qu'à 25 MHz.

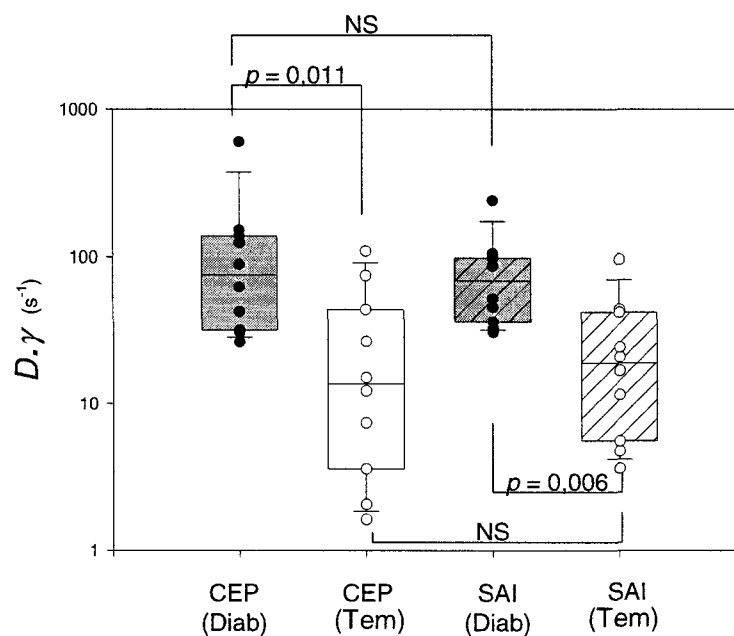


Figure 4.1 : Le paramètre $D.\gamma$ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Tem - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 25 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %.

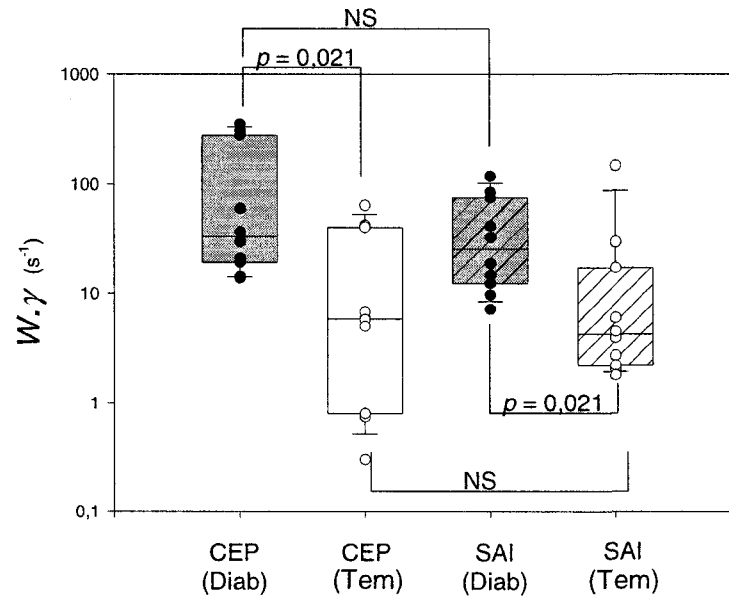


Figure 4.2 : Le paramètre $W.\gamma$ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Tem - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 25 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %.

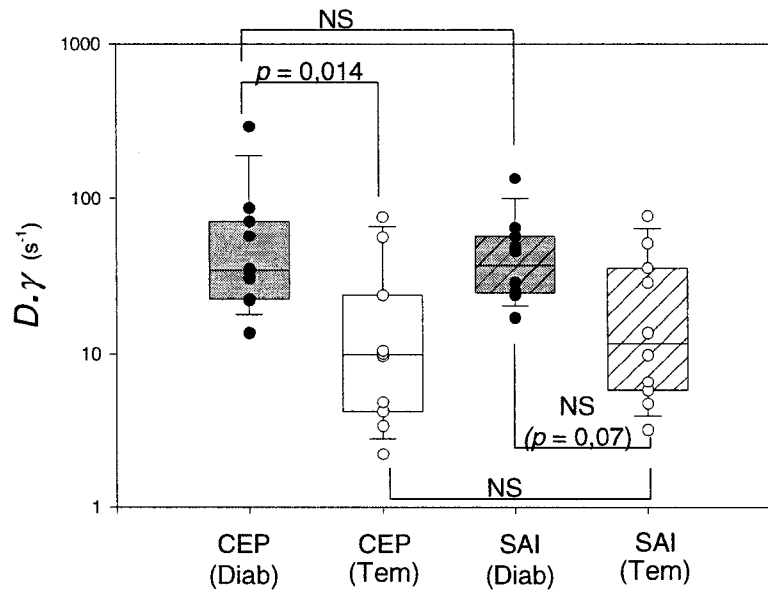


Figure 4.3 : Le paramètre $D.\gamma$ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Tem - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 35 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %.

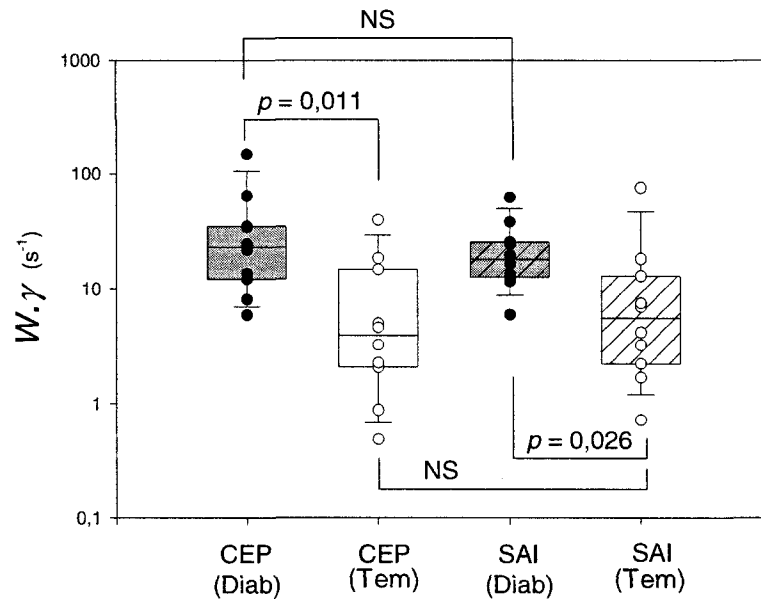


Figure 4.4 : Le paramètre $W.\gamma$ en fonction du groupe d'individus (Diab – diabétiques, Tem - témoins) pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 35 MHz. Chaque diagramme en boîte représente la médiane et les percentiles à 25 % et 75 %.

4.4.2 Paramètres d'atténuation

Afin de valider la méthode SFSAE qui calcule simultanément les paramètres D , W et α , les coefficients d'atténuation α estimés ont été tracés en fonction de l'épaisseur de la peau des individus mesurée sur l'image échographique (**figure 4.5** et **tableau 4.6**). Le coefficient β en dB/MHz/mm a été obtenu en traçant une régression linéaire de type

$y = \beta x + b$, où x représente l'épaisseur de la peau au dessus du vaisseau et b , l'origine de la droite. Pour évaluer l'atténuation de la peau, les valeurs de α ont été calculées sur chacune des régions d'intérêt contrairement aux valeurs de D et W qui ont été moyennées sur les trois régions d'intérêt. Ceci s'explique par le fait que l'épaisseur de la peau pouvait varier d'une région à une autre. Par conséquent, trois valeurs de α en fonction des épaisseurs de la peau ont été utilisées pour chaque individu afin de calculer des régressions linéaires.

Un exemple de régression linéaire est illustré à la **figure 4.5** pour la peau du pied chez les patients diabétiques avec la sonde de 25 MHz. Les constantes β , b et les coefficients de régression R^2 pour les autres cas sont montrés au **tableau 4.6**.

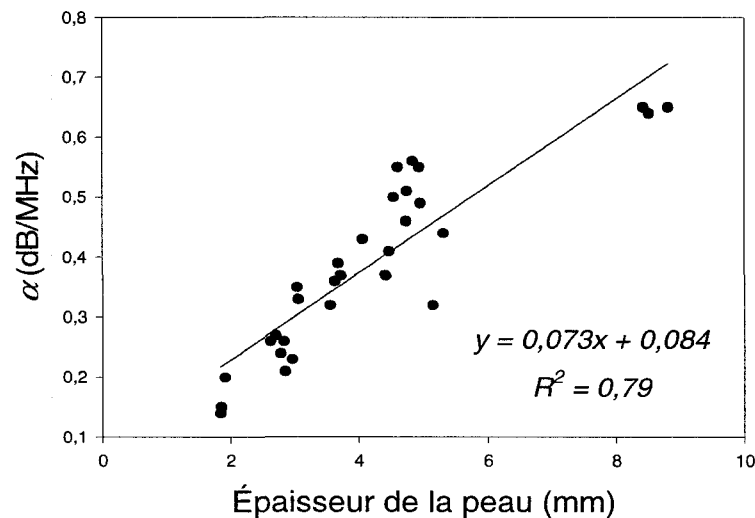


Figure 4.5 : Coefficient d'atténuation α (dB/MHz) en fonction de l'épaisseur de la peau du pied chez les patients diabétiques à 25 MHz. Une régression linéaire de type $y = \beta x + b$ est tracée, où β représente la pente de la droite, x , l'épaisseur de la peau et b , une constant à l'origine. R^2 est le coefficient de régression de la droite.

Tableau 4.6 : Équations des régressions linéaires de l'atténuation α des sujets témoins (Ctr) et diabétiques (Diab) en fonction de l'épaisseur de la peau ainsi que les coefficients de régression (R^2) correspondant à 25 MHz et 35 MHz au bras et au pied

Fréquence (MHz)	Peau	Groupe d'individus	Eqn de la régression ($\beta x + b$)	R^2 *
25	Bras	Ctr	$0,074 x + 0,066$	0,44
		Diab	$0,097 x + 0,077$	0,65
	Pied	Ctr	$0,059 x + 0,13$	0,75
		Diab	$0,073 x + 0,08$	0,79
35	Bras	Ctr	$0,079 x + 0,072$	0,71
		Diab	$0,118 x - 0,001$	0,69
	Pied	Ctr	$0,059 x + 0,101$	0,89
		Diab	$0,057 x + 0,163$	0,69

* Toutes les régressions étaient significatives ($p < 0,0001$)

De façon générale, nous obtenons des coefficients d'atténuation β semblables pour les deux transducteurs de 25 et 35 MHz. De plus, β est plus élevé chez les sujets diabétiques comparé aux sujets témoins, et est plus élevé pour la peau du pied comparé au bras. Ainsi pour les sujets sains, nous obtenons $\beta \approx 0,07$ dB/MHz/mm pour la peau du bras et $\beta \approx 0,060$ dB/MHz/mm pour la peau du pied, alors que nous obtenons $\beta \approx 0,1$ dB/MHz/mm pour le bras des sujets diabétiques. Seul, β au niveau de pied diffère chez les patients diabétiques entre les deux transducteurs ($\beta = 0,073$ dB/MHz/mm à 25 MHz versus $\beta = 0,057$ dB/MHz/mm à 35 MHz).

5. DISCUSSION

Ce chapitre traite de l'analyse des résultats obtenus au chapitre précédent, notamment des données physiologiques et hémodynamiques, des index d'agrégation *in vitro* et *in vivo*, ainsi que des limitations et améliorations possibles de ce protocole.

5.1 Données physiologiques

Comme le montre le **tableau 4.1**, l'IMC ($p < 0,001$), l'HbA1C ($p < 0,001$), le Fb ($p < 0,001$), l'Hp ($p < 0,001$) et la CRP ($p = 0,002$) sont significativement différents entre les groupes témoin et diabétique. L'IMC est nettement supérieur pour le groupe cible puisque la majorité des patients diabétiques participant à ce projet présentait un surplus de poids considérable (le plus obèse des patients avait un IMC de 42). Ceci s'explique par le fait que l'obésité est un facteur de risque pour le diabète de type 2. Il était également prévisible d'avoir un HbA1C significativement plus élevé chez les diabétiques. Selon la classification de l'équilibre glycémique présentée au **tableau 2.3**, trois des patients du groupe cible étaient des diabétiques bien équilibrés et les sept autres étaient mal équilibrés.

Concernant les concentrations de protéines plasmatiques plus élevées chez les diabétiques, ces résultats concordent avec plusieurs études pour le Fb [53, 58, 60], l'Hp et la CRP [58]. Les concentrations de ces protéines plasmatiques supérieures à la normale sont des indicateurs du niveau d'inflammation élevé lié à la pathogénèse du diabète de type 2. Certaines études ont même décelé une concentration de Fb plus élevée entre les patients diabétiques ayant une artériopathie et ceux sans artériopathie [52, 60], et également entre les diabétiques bien équilibrés et ceux mal équilibrés [52, 53, 56]. Dans le cadre de ce projet, différencier les différentes classes de diabète n'a pas été possible à cause d'un échantillonnage trop faible (voir la section 5.7).

Comme le montre également le **tableau 4.1**, étonnamment le Chol ($p = 0,016$) et le LDL ($p = 0,011$) étaient plus faibles chez les diabétiques que chez les sujets témoins, alors que le HDL était plus faible ($p < 0,01$) et que Trig était plus élevé chez les diabétiques ($p = 0,05$). Nous pouvons expliquer ceci par le fait que la majorité des patients diabétiques prenaient des hypolipidémifiants ou des hypocholestérolémiants (voir le **tableau 5.2** plus loin dans ce chapitre). L'effet de ces médicaments aurait diminué le mauvais cholestérol de ces patients à un tel point qu'il serait plus faible que celui des sujets témoins.

Finalement, l'ITH qui est le ratio de la pression systolique de la cheville sur celle du bras, était moins élevé chez les sujets diabétiques ($p < 0,001$). Un ITH inférieur à 1 indiquerait la présence de sténoses aux membres inférieurs. Nous avons remarqué que ces index pour les sujets diabétiques étaient relativement élevés pour les patients de classes de Rutherford II à V. Ceci peut être expliqué par le fait que l'ITH peut être surévalué à cause de la médiacalcosse artérielle¹¹ présente chez les diabétiques.

5.2 Indices d'agrégation *in vitro*

Selon le **tableau 4.2** qui montre les index d'agrégation *in vitro* pour le sang ajusté à 40 % d'hématocrite, t_A ($p = 0,003$), t_F ($p < 0,001$) et S_{10} ($p = 0,007$) différaient significativement entre les deux groupes d'individus. Pour le **tableau 4.3** qui indique les index obtenus avec l'hématocrite non ajusté, t_A ($p = 0,013$), t_F ($p = 0,002$), γ_D ($p < 0,001$) et γ_S ($p = 0,013$) étaient également statistiquement différents entre les sujets témoins et diabétiques. Les similitudes entre les valeurs des **tableaux 4.2** et **4.3** s'expliquent par le fait que l'hématocrite ne différait pas entre les deux groupes (**tableau 4.1**). Des t_A et t_F plus petits, ainsi qu'un S_{10} plus élevé (S_{10} est inversement proportionnel à t_A et t_F) indiquent une cinétique d'agrégation plus rapide lorsque l'écoulement est arrêté pour favoriser l'agrégation. De plus, γ_D et γ_S supérieurs chez les diabétiques révèlent des forces

¹¹ La médiacalcosse signifie une calcification de la média, une des parois de l'artère.

d'adhésion plus importantes puisque des cisaillements plus élevés sont nécessaires pour désagréger les rouleaux.

Les résultats des **tableaux 4.2 et 4.3** suggèrent que t_A , t_F et S_{10} ne seraient pas affectés par l'hématocrite, mais que les seuils de cisaillement γ_D et γ_S le seraient. Ceci porte à croire qu'un hématocrite non ajusté pourrait avoir un impact sur des mesures de l'érythroagrégamètre comme le suggère [64]. Ainsi, des seuils de dissociation plus grands au **tableau 4.2** suggèrent que les forces d'adhésion sont plus élevées entre les globules rouges du fait que nous avons augmenté la concentration des protéines plasmatiques pro-agrégant tel le fibrinogène pour obtenir un hématocrite de 40 %.

Cependant, avec ou sans normalisation de l'hématocrite, les index *in vitro* suggèrent des niveaux d'agrégabilité plus élevés chez les sujets diabétiques atteints d'artériopathie comparés aux sujets témoins, ce qui est cohérent avec la littérature [52-56, 58, 60].

5.3 Données hémodynamiques

Concernant les données hémodynamiques rapportées aux **tableaux 4.4 et 4.5**, nous remarquons des différences significatives entre les deux populations au niveau des taux de cisaillements veineux ($p = 0,009$ pour CEP et SAI) et des vitesses moyennes veineuses ($p = 0,054$ pour CEP et $p = 0,011$ pour SAI). Au niveau artériel, V_{moy_PED} ($p = 0,01$), RI_{PED} ($p = 0,03$) et PI_{PED} ($p = 0,003$) différaient entre les deux groupes d'individus.

Une augmentation de vitesse au niveau des membres inférieurs chez les diabétiques¹² a été observée à maintes reprises dans la littérature [71-73]. Deux phénomènes peuvent expliquer cette réalité : l'épaississement de la membrane basale au

¹² Ici, nous parlons de diabétiques qui sont à un stade élevé dans l'évolution de la maladie, ce qui est le cas des sujets choisis pour notre étude.

niveau des capillaires et des artérioles [74], ainsi que la présence accrue de micro-fistules artério-veineuses¹³ (AV) chez les patients diabétiques atteints de neuropathie [45].

Ainsi, l'épaississement de la membrane basale des capillaires et des artérioles a été rapporté chez les diabétiques [45, 71, 74]. Ce phénomène, qui serait beaucoup plus accentué au niveau des membres inférieurs, a également été observé dans la rétine de l'œil chez les diabétiques [75]. Il résulterait d'une dysfonction endothéliale causée par une hyperglycémie chronique. En s'épaississant, les vaisseaux ne peuvent se dilater et perdent leur capacité d'autorégulation. L'effet de cette absence d'autorégulation entraîne une augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires et une augmentation du débit sanguin dans les artérioles.

La présence de micro-fistules AV pourrait expliquer les vitesses veineuses plus élevées au niveau du pied chez le groupe cible. Parmi nos patients diabétiques, nous avons observé que plusieurs d'entre eux avaient des problèmes de varices ou d'ulcères veineux au niveau du pied ou de la cheville. Ainsi, il a été observé que les patients ayant des ulcères au pied avaient une présence considérable de fistules AV comparés aux sujets témoins [76]. De plus, un autre phénomène pourrait expliquer les vitesses veineuses supérieures au pied chez les diabétiques : sachant que la vitesse artérielle est plus élevée par l'absence d'autorégulation du débit, un retour veineux plus élevé résulterait de ce phénomène.

Par contre, nous avons également trouvé que la vitesse moyenne au niveau de la veine du bras différait entre les deux populations. Ceci pourrait résulter d'un mécanisme de compensation de l'hyperagrégation érythrocytaire chez les patients diabétiques. Puisque l'agrégation est favorisée dans les veines à cause d'un écoulement moins rapide, ce mécanisme ne serait alors pas observé dans l'artère humérale. Ainsi, une vitesse élevée entraîne un taux de cisaillement élevé qui favorise la désagrégation des globules rouges. Cette hypothèse sera abordée plus en détail à la prochaine section.

¹³ Les fistules artério-veineuses sont des passages directs du sang artériel vers le sang veineux dus à une absence ou un dysfonctionnement des réseaux capillaires.

Il est à noter qu'une augmentation des vitesses artérielles et veineuses n'est pas un phénomène exclusif aux diabétiques atteints d'artériopathie des membres inférieurs, car il a également été observé chez des diabétiques atteints de rétinopathie [77].

Finalement, concernant RI_{PED} et PI_{PED} qui sont plus faibles chez les diabétiques, ces deux valeurs qui sont associées à la résistance au flot et à la compliance de l'artère [78] montrent de plus que l'écoulement sanguin est perturbé chez les diabétiques [76, 79].

5.4 Indices d'agrégation in vivo

5.4.1 Comparaison des paramètres d'agrégation in vivo

Tels qu'observés aux **figures 4.1 à 4.4**, $D.\gamma$ et $W.\gamma$ se sont avérés statistiquement différents entre les deux groupes pour les veines CEP et SAI à 25 MHz, tandis qu'à 35 MHz, seul le paramètre $W.\gamma$ était significativement différent ($p = 0,07$ pour $D.\gamma$, ce qui est toutefois proche de la limite statistique). Tel que défini antérieurement [67, 69], D est un indice des tailles d'agrégats et W représente l'organisation structurale des agrégats. En regardant le **tableau D.1** de l'annexe D, il est possible de constater que D et W mesurés *in vivo* semblaient donner des valeurs plus élevées chez les diabétiques mais sans en être significativement différentes entre les deux groupes. De plus, nous pouvons observer que les valeurs de D et W sont plus petites que dans les études de [67, 69] puisque les taux de cisaillement *in vivo* sont beaucoup plus élevés que dans les études *in vitro*.

Puisque l'agrégabilité érythrocytaire est augmentée chez les patients diabétiques de type 2 (selon nos mesures *in vitro* rapportées au **tableau 4.3** et plusieurs études citées à la section 2.3.2), nous pouvons donc conclure que cette hyper-agrégabilité n'engendre pas d'augmentations significatives *in vivo* de la taille des agrégats et du facteur de

structure W chez les patients diabétiques, à cause des niveaux de cisaillement supérieurs observés dans les veines de ce groupe d'individus (tel que montré au **tableau 4.4**).

Ceci constitue une nouvelle observation jamais rapportée dans la littérature. L'augmentation du cisaillement veineux, et possiblement artériel, pourrait constituer un mécanisme d'autorégulation visant à maintenir la perfusion tissulaire chez les sujets diabétiques chroniques, tels que ceux de notre étude. Ainsi, dans le cas de crise aiguë, l'hyperagrégation peut entraîner des désordres hémodynamiques transitoires qui seraient normalisés par ce mécanisme d'autorégulation lorsque la crise devient chronique. Cependant, des travaux supplémentaires devront être effectués afin de valider cette hypothèse.

Par les paramètres $D.\gamma$ et $W.\gamma$ plus élevés chez les diabétiques, ceux-ci possèdent donc une agrégabilité érythrocytaire statistiquement plus élevée comparée aux sujets témoins. Par contre, il s'est avéré intéressant de constater que $D.\gamma$ et $W.\gamma$ n'étaient pas statistiquement différents entre la veine CEP et SAI pour un même groupe d'individus. Ceci nous suggère que l'hyperagrégabilité chez les diabétiques atteints d'artériopathie des membres inférieurs ne diffère pas entre la circulation locale d'un endroit cible (*i.e.*, le pied) et la circulation systémique (*i.e.*, celle du bras), ce qui est une observation différente de celle rapportée par Pargalava et al. [61]. Cette différence peut être expliquée par le fait que leurs mesures d'agrégation ont été réalisées juste avant l'amputation de l'orteil ou du pied du patient diabétique. À un stade où le membre ne peut être sauvé, le niveau d'inflammation local pourrait être plus élevé qu'au niveau systémique, ce qui entraînerait une hyperagrégation encore plus prononcée au niveau du pied qui ne pourrait plus être régulée par une augmentation des forces de cisaillement.

Il est à noter qu'à ce jour, l'algorithme SFSAE étudié sur des modèles *in vitro* n'a été appliqué que sur des données à 25 MHz [67]. Si nous comparons les résultats de D et de W entre les deux transducteurs (voir tableaux D.1 et D.2 de annexe D), nous remarquons que les valeurs à 35 MHz semblent légèrement plus faibles qu'à 25 MHz. Ceci pourrait être expliqué par le choix d'une bande passante différente d'un transducteur à un autre. Par conséquent, la fonction de coût $F(D, W, \alpha)$ minimisée par l'algorithme

SFSAE (eqn 3.3) donnerait des valeurs non similaires à ces deux fréquences. Une autre possibilité qui expliquerait cette différence est qu'à 35 MHz, la linéarité de l'atténuation en fonction de la fréquence pourrait ne plus s'appliquer (eqn 2.5) : ceci donnerait des valeurs d'atténuation semblables (**tableau 4.6**, voir section 4.4.2) mais des valeurs différentes de D et W (**tableau D.1**, voir annexe D) pour un même vaisseau. Des travaux supplémentaires devraient être effectués afin de mieux comprendre l'application de l'algorithme SFSAE sur des données à 35 MHz.

Il paraît difficile de comparer nos résultats *in vivo* avec ceux de la littérature existante puisque la présente étude est la première où des mesures quantitatives *in situ* de l'agrégation sont rapportées (voir section 2.2.5). Seul, Cloutier et al [22] ont conclu que des mesures de rétrodiffusion ultrasonore Doppler pouvaient permettre de détecter des niveaux d'agrégation différents *in situ* entre deux populations, soit des sujets hyperlipidémiques et des sujets témoins. Kitamura et al [40] et Yu et al [41] ont, quant à eux, remarqué que les ultrasons à haute fréquence pouvaient détecter des niveaux d'agrégation différents en fonction des cisaillements appliqués au vaisseau *in vivo*. Les résultats de notre projet semble montrer les mêmes tendances que celles rapportées antérieurement [22].

5.4.2 Comparaison des valeurs d'atténuation

Comme montrés à la **figure 4.5** et au **tableau 4.6**, les coefficients d'atténuation α en dB/MHz ont été évalués en fonction de l'épaisseur de la peau. Pour les sujets témoins, nous avons obtenu une atténuation β à $\approx 0,07$ dB/MHz/mm, pour la peau du bras et de $\beta \approx 0,06$ dB/MHz/mm pour la peau du pied. Chez les sujets diabétiques, nous obtenons une atténuation β à $\approx 0,1$ dB/MHz/mm, pour la peau du bras et de $\beta \approx 0,06$ à $0,07$ dB/MHz/mm pour la peau du pied.

Afin de comparer nos résultats d'atténuation, le **tableau 5.1** résume les différentes valeurs de β trouvées dans la littérature et obtenues *in vivo* à haute fréquence au niveau de l'avant-bras, ainsi que la méthode d'estimation utilisée.

Tableau 5.1 : Comparaison des différents coefficients d'atténuation (β) mesurés *in vivo* selon la littérature

Auteurs et années	Coefficients β estimés (dB/MHz/mm)	Méthode d'estimation	Localisation	Fréquence centrale (MHz)
Guittet et al. [31]	0,08 - 0,36	CFS _A	avant-bras (derme)	40
Guittet et al. [80]	0,07 - 0,36	CFS _A	avant-bras (derme)	40
Raju et al [81]	derme : 0,08 - 0,39 g. sub. : 0,01 - 0,06	MNB	avant-bras (derme et g. sub.)	28, 30, 44

g. sub. : gras subcutané; CFS_A : « Centroid frequency shift » par spectre autorégressif; MNB : « Multi-narrowband ».

En comparant les coefficients d'atténuation β obtenus par la méthode SFSAE pour nos deux groupes de patients (**tableau 4.6**) avec ceux de la littérature, nous remarquons que les valeurs de β de notre étude se situent vers la limite supérieure du gras subcutané et vers la limite inférieure du derme (**tableau 5.1**). Ceci pourrait être expliqué par le fait que α calculé par le SFSAE est global et qu'il somme l'atténuation de chacune des couches de tissus (voir eqn 3.10). Ainsi, β de la peau du bras est plus petit que celui du pied, ce qui suggère que la peau du pied aurait une couche adipeuse plus épaisse que celui du bras puisque la veine saphène interne du pied est plus profonde que la veine céphalique du bras.

En observant le **tableau 4.6**, nous remarquons de plus que les valeurs de β ont une tendance à être plus élevées chez les diabétiques (sauf pour le cas de la peau du pied à 35 MHz). Une peau plus épaisse chez les patients diabétiques causée par une modification du collagène expliquerait l'atténuation qui est plus élevée [82]. Ainsi, ce changement des propriétés de la peau chez les diabétiques s'observerait tant au niveau du bras qu'au niveau du pied.

Concernant la différence des β entre les deux transducteurs pour chacun des groupes d'individus, les valeurs sont assez semblables, sauf pour le cas de la peau du pied à 35 MHz chez les diabétiques ($\beta = 0,057$ à 25 MHz et $\beta = 0,073$ dB/MHz/mm à 35 MHz). Puisque nous avons supposé que l'atténuation de la peau est plus élevée chez les diabétiques, nous pouvons donc nous questionner sur la valeur de β obtenue dans le cas du pied chez les diabétiques à 35 MHz. Nous pouvons supposer que cette légère différence serait causée par une ou deux données extrêmes qui ont changé la régression linéaire obtenue.

Comme mentionné à la section 5.4.2, le SFSAE pourrait dépendre de la fréquence du transducteur, et des travaux supplémentaires sur l'application de cet algorithme à 35 MHz s'avèrent donc nécessaires.

Finalement, une comparaison des β obtenus avec le SFSAE et les autres méthodes d'estimation de l'atténuation telles que le MNB et le CFS_A aurait dû être effectuée. Ce point sera abordé à la section 5.6.

5.5 Hyperagrégation érythrocytaire et mesures ultrasonores in vivo

Dans la section précédente, nous avons donc trouvé une différence significative entre les deux groupes au niveau des mesures d'agrégabilité *in vivo* qui tiennent compte du cisaillement sanguin affectant la taille des agrégats. Dans le cas des patients diabétiques, $D.\gamma$ (et également $W.\gamma$) était plus élevé et expliqué par une taille d'agrégats similaire au groupe témoin, malgré des niveaux de cisaillement γ beaucoup plus grands.

Un premier point important à souligner est que l'hyperagrégation érythrocytaire *in vivo* n'est pas toujours reliée à une réduction du flot sanguin comme le suggèrent plusieurs études animales [83]. Notre étude a permis de quantifier l'agrégation localement, ce qui ne peut être prédit par des mesures *in vitro*. L'utilisation des ultrasons pour caractériser l'agrégation des globules rouges *in situ* permet donc de déterminer si

l'hyperagrégation est locale ou non, et si elle est liée intrinsèquement aux paramètres hémodynamiques affectés par la pathologie vasculaire.

Malgré tout, la relation entre l'hyperagrégation et les pathologies vasculaires reste encore nébuleuse. L'hyperagrégation précède-t-elle la pathologie? Les liens entre ces deux désordres sont-ils semblables d'une pathologie à une autre? Dans les cas des pathologies reliées à l'hyperagrégation autres que le diabète, si $D \cdot \gamma$ est élevé, est-ce à cause du D ou du γ qui augmente? Ainsi, cette étude pilote montre que la caractérisation *in situ* de l'agrégation érythrocytaire est possible et que la méthode ultrasonore pourrait éclaircir plusieurs des points mentionnés ci-haut.

Un deuxième point important à souligner dans cette étude est l'utilisation de l'algorithme du SFSAE pour caractériser l'agrégation érythrocytaire *in vivo*. Cette algorithme permet de déterminer des index de tailles d'agrégats en tenant compte de l'atténuation de la peau. Ainsi, cette technique n'utilise pas des valeurs *a priori* d'atténuation comme l'ont fait plusieurs études [22, 41]. Nous avons vu que les valeurs d'atténuation pouvait changer d'un groupe de patients et d'un endroit à un autre (au bras ou au pied), d'où l'importance de bien calculer l'atténuation pour chaque individu.

5.6 Critique sur la sélection des patients

Afin d'expliquer l'hyper-agrégabilité trouvée *in vitro* et *in vivo* chez les sujets diabétiques, nous allons discuter des critères d'inclusion et d'exclusion appliqués à cette population. Lors de la sélection des patients, des critères ont été émis afin de diminuer des effets confondants pouvant influencer l'interprétation des résultats. Comme mentionné à la section 3.1, les sujets sains devaient être non fumeurs, ne souffrir d'aucune maladie cardiovasculaire, ne prendre aucun médicament, et ne pas souffrir d'embonpoint. Cependant, la sélection des patients diabétiques n'a pas été aussi catégorique pour les raisons qui suivent.

Premièrement, rares sont les sujets diabétiques qui ne souffrent pas d'hypertension, d'hypercholestérolémie ou d'autres maladies cardiovasculaires. L'obésité et le tabagisme sont également étroitement liés à ces pathologies. Il est donc important de noter que tous ces facteurs ont des effets connus sur l'agrégation érythrocytaire (voir section 2.1.5). Ils favorisent tous une augmentation de l'agrégation. Deuxièmement, la totalité des patients sélectionnés prenaient des médicaments pour contrôler leur diabète, leur hypertension, leur taux de cholestérol ou autres pathologies. Afin de résumer l'effet de certains médicaments sur le phénomène d'agrégation, le **tableau 5.2** liste les prescriptions que prenaient les patients diabétiques classés en deux tableaux, soit (a) la liste des médicaments ayant un effet connu sur l'hémorhéologie sanguine, et (b) la liste de ceux n'ayant aucun effet connu selon la littérature.

Il est à noter que toutes les références trouvées au **tableau 5.2.a** sur l'effet des médicaments ont été réalisées à partir d'études humaines de type «avant-après»¹⁴. Au **tableau 5.2.b**, l'impact de ces médicaments est inconnu mais un lien existe entre la pathologie traitée par ce médicament et la présence de désordres rhéologiques sanguins. Selon ce tableau, les médicaments dont l'effet est connu sur l'agrégation érythrocytaire sont tous hypoagrégeants. Comme hypothèse, nous pouvons dire que l'hyperagrégation des patients diabétiques aurait pu être encore plus prononcée si ces derniers n'avaient pris de médicaments pour réguler leur glycémie, cholestérol ou hypertension.

¹⁴ Des études cliniques «avant-après» consistent à prendre des mesures sur la patient avant et après la prise du médicament afin de comparer ces mesures entre elles.

Tableau 5.2 : Liste des médicaments (Rx) consommés par les patients diabétiques et leur effet sur la rhéologie sanguine. (a) Liste de Rx trouvés ayant un effet connu sur l'agrégation érythrocytaire selon la littérature ; (b) Liste de Rx ayant aucun effet connu selon la littérature

(a)

Pathologie	Nom du Rx	Résultats obtenus sur la rhéologie sanguine
Hypercholestéromie	Statines (Atorvastatine)	↓ VP [84]
	Fenofibrates	↓ VP ; ↓ VS [85]
Hypertension	IECA (Ramipril)	↓ AE ; ↓ VS [86]
	Diurétiques (hydrochlorothiazide)	Effet NS [87]
	Bloqueurs des canaux calciques	↓ VP ; ↓ VS ; ↓ AE [88]
	Bêta-bloqueurs	↓ VS [89]
Diabète	Insuline	↓ VS [56] [90]
Prévention cardiovasculaire	Aspirine	↓ AE [91]; ↓ VS [92]
Hypothyroïdisme	Levothyroxine	↓ VP ; ↓ VS [93]

(b)

Pathologie	Nom du Rx
Hypercholestéromie	Rosuvastatine (statine) [†]
Hypertension	ARA II [†]
Diabète	Agents oraux antiglycémiques [†]
Autres	Terbinafine (infection du pied); Docusate sodium (constipation); Prégabaline (douleur des nerfs); Gabapentin (dépression); Oméprazole (acidité de l'estomac);
	Dipyridamole (prévention des maladies cardiovasculaires) [†] ; Alendronate (ostéoporose); Centrum Select et Vitamine D (vitamines); Oxybutynine (incontinence); Fer (anémie) [†]

[†] Aucune étude «avant-après» n'a été trouvée sur l'effet de ce médicament particulier malgré les recherches liant la pathologie aux désordres hémorhéologiques.

Rx : Médicaments; ↓ VP : Diminution de la viscosité plasmatique; ↓ AE : Diminution de l'agrégation érythrocytaire; NS : Non significatif; IECA : Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; ARA II : Antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II.

5.7 Limitations et améliorations possibles du protocole

Certaines améliorations pourraient être appliquées à ce projet. En premier lieu, la taille de l'échantillonnage était assez restreinte. En conséquence, la différenciation des patients diabétiques de diverses classes de Rutherford n'a pu être effectuée dans ce projet. En deuxième lieu, pour les veines dont la vitesse Doppler était trop faible ($< 0,6$ cm/s), nous avons dû supposer une vitesse minimale de $0,6$ cm/s ce qui peut avoir entraîné une surestimation possible du cisaillement. Ce cas est apparu chez quatre sujets sains et aurait pu être éliminé en utilisant une sonde à plus haute fréquence [66] puisque l'effet Doppler est amplifié lorsque la fréquence augmente (les tests Doppler ont été réalisés avec un appareil clinique à 7 MHz). Pour des raisons de sécurité (Santé Canada n'a pas approuvé l'utilisation humaine de l'échographe haute fréquence Visualsonics en mode Doppler), les sondes de l'appareil ont dû être utilisées qu'en mode B car la puissance Doppler émise dépasse le seuil critique accepté pour l'humain. Un autre moyen qui aurait pu s'avérer efficace pour visualiser les vitesses dans les veines serait d'utiliser une approche de traitement d'image basé sur l'autocorrélation des taches échographiques («speckle tracking»). Le «speckle tracking» [94] permet d'obtenir un profil de vitesse sur tout le diamètre du vaisseau, contrairement au Doppler qui estime la vitesse sur une fenêtre d'intérêt seulement. Cependant, le «speckle tracking» comporte les inconvénients suivants : il est un mauvais estimateur pour les vitesses élevées et le rapport signal-sur-bruit doit être élevé pour appliquer cette méthode (atténuation faible et niveau d'agrégation élevé). De plus, les acquisitions à effectuer pour mettre en place un algorithme de «speckle tracking» doivent être réalisées en absence de mouvement de la sonde échographique pour éliminer les artéfacts de décorrélation.

En troisième lieu, nous avons observé que le SFSAE surestime les paramètres D et W lorsque nous avons préliminairement analysé des données sur des artères *in vivo*. Puisque celles-ci sont généralement plus profondes que les veines SAI ou CEP, l'atténuation α y était plus élevée. Parce que l'atténuation augmente en fonction de la fréquence du transducteur et de la profondeur (voir eqn. 3.9), les vaisseaux profonds ne

peuvent être imagés avec le système à haute résolution Visualsonics. Lors de ces études préliminaires, les paramètres du SFSAE ont alors estimé des indices d'agrégation pour les artères qui dépassaient de beaucoup ceux des veines, ce qui est illogique puisque les cisaillements sont largement plus élevés dans les artères. Un moyen de déterminer si l'estimation de D , W et α est valide est de calculer le coefficient de rétrodiffusion sanguin (BSC). Nous calculons tout d'abord un BSC sans tenir compte de l'atténuation (BSC_{exp} par l'éqn 3.12). Ensuite par la valeur de α estimée par le SFSAE, nous calculons le BSC compensé en atténuation ($BSC_{exp} \times e^{-4dx\alpha}$). Si la dépendance fréquentielle du BSC compensé en atténuation est plus élevée que 4, ceci porte à croire que les composantes à haute fréquence ne représenteraient que du bruit¹⁵. À cause d'une atténuation trop grande qui rend le signal RF très bruité, les données sur les artères n'ont donc pas été traitées, mêmes celles de la pédieuse au niveau du pied¹⁶.

En quatrième lieu, comme mentionné à la section 5.4.2, des comparaisons de l'atténuation β obtenue avec la méthode SFSAE et d'autres méthodes d'estimation telles que le MNB et le CFS_A auraient dû être effectuées pour chaque patient. Cependant, toutes ces méthodes nécessitaient une normalisation du signal RF obtenu à partir d'un réflecteur plan. Cette normalisation n'a pas été possible dans ce projet puisque des réflexions multiples causées par la membrane de la sonde du Visualsonics faussaient le signal RF du réflecteur plan. Les solutions possibles pour corriger ce problème seraient d'éliminer les réflexions multiples ou d'utiliser un transducteur monoélément pour estimer l'atténuation.

D'autres suggestions possibles sont (1) de faire une étude à différents cisaillements, c'est-à-dire de reproduire des cinétiques d'agrégation *in vivo*, en comprimant le vaisseau par application d'une pression pour analyser les paramètres D , γ et W , (2) de corréler des mesures d'agrégation et d'index-tibial-huméral avec des données d'oxymétrie transcutanée, (3) de faire une étude prospective sur l'agrégation

¹⁵ Lorsque les diffuseurs se comportent selon une loi de Rayleigh (suspension sanguine non-agrégante), la dépendance fréquentielle est de 4 (voir section 2.2.3). Lorsque les diffuseurs amènent un comportement non-Rayleigh (sang agrégant), la dépendance fréquentielle est inférieure à 4.

érythrocytaire des patients diabétiques par des suivis réguliers afin de voir l'évolution de l'inflammation sur l'hyperagrégation, (4) d'observer l'agrégation dans des veines de plus gros calibres avec des transducteurs à basse fréquence, et (5) de choisir des patients avant amputation du pied pour voir si il y a perte d'autorégulation de l'hyper-agrégation par une augmentation du débit pour cette catégorie d'individus, et une différence entre l'agrégation ciblée au niveau du pied et celle systémique au niveau du bras.

¹⁶ L'artère pédieuse est une des artères les plus superficielles du corps humain mais elle est plus profonde que les veines céphalique et saphène interne.

CONCLUSION

Ce projet avait pour objectif de caractériser l'agrégation érythrocytaire *in situ* et *in vivo* entre deux populations, soit une population normo-agrégante et une population hyper-agrégante. Des signaux ultrasonores rétrodiffusés par les globules rouges ont été enregistrés dans les veines du bras et du pied chez des sujets sains et des patients diabétiques atteints d'artériopathie des membres inférieurs à l'aide de transducteurs à haute fréquence (25 MHz et 35 MHz). Des paramètres d'agrégation *in vivo* ont été calculés à partir d'un estimateur de taille et d'atténuation par le facteur de structure et des mesures hémodynamiques. Ces mesures *in vivo* plus élevées chez les diabétiques suggèrent que ceux-ci ont une agrégabilité plus importante de leurs globules rouges, ce qui est cohérent avec les index d'agrégation mesurés *in vitro*, mais des tailles d'agrégats similaires au groupe témoin. Le niveau d'inflammation élevé, les désordres hémodynamiques artériels et veineux sont donc tous en lien avec l'hyperagrégabilité érythrocytaire. Cependant la relation de cause à effet entre l'hyperagrégation et les pathologies vasculaires reste encore nébuleuse. Par cette étude pilote, la caractérisation *in situ* de l'agrégation des globules rouges est donc possible, ce qui ouvre la voie à une meilleure compréhension pathophysiologique de ce phénomène.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. N. Marieb, *Anatomie et physiologie humaines, 2e Édition*, Édition du Renouveau Pédagogiques ed. Montréal, 1999.
- [2] X. Weng, G. Cloutier, R. Beaulieu, and G. O. Roederer, "Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation," *Am J Physiol*, vol. 271, pp. H2346-52, Dec 1996.
- [3] S. Chien, *Biophysical behavior of red cells in suspensions, in the Red Blood Cell* vol. II chapter 26. New York: D. M. Surgenor, Academic, 1975.
- [4] A. Pribush, D. Zilberman-Kravits, and N. Meyerstein, "The mechanism of the dextran-induced red blood cell aggregation," *Eur Biophys J*, vol. 36, pp. 85-94, Feb 2007.
- [5] B. Neu and H. J. Meiselman, "Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions," *Biophys J*, vol. 83, pp. 2482-90, Nov 2002.
- [6] B. Neu, R. Wenby, and H. J. Meiselman, "Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation," *Biophys J*, vol. 95, pp. 3059-65, Sep 15 2008.
- [7] D. Fatkin, T. Loupas, J. Low, and M. Feneley, "Inhibition of red cell aggregation prevents spontaneous echocardiographic contrast formation in human blood," *Circulation*, vol. 96, pp. 889-96, Aug 5 1997.
- [8] H. L. Goldsmith and V. T. Turitto, "Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis," *Thromb Haemost*, vol. 55, pp. 415-35, Jun 30 1986.
- [9] M. Y. Jaffrin, Goubel F., *Biomécanique des fluides et des tissus*. Paris: Masson, 1998.
- [10] I. Paraschivoiu, M. Prud'homme, L. Robillard, and P. Vasseur, *Mécanique des Fluides*, 1st ed. Montréal: Presses Internationales Polytechnique, 2004.
- [11] M. Dauzat, G. Deklunder, J. P. Laroche, F. Vivens, J. M. De Bray, and F. M. Lopez, "Bases d'interprétation des signaux Doppler," CHU Nîmes, CHU Lille, CHU Montpellier, CHU Angers, p. 18.
- [12] J. F. Polak, *Peripheral vascular sonography: a practical guide*, 2nd ed. Philadelphia, 2004.
- [13] C. Bucherer, C. Lacombe, and J. C. Lelievre, "Viscosité du sang humain," in *Biomécanique des fluides et des tissus*, Masson, Ed. Paris, 1998, pp. 31-51.
- [14] H. Schmid-Schonbein, P. Gaehtgens, and H. Hirsch, "On the shear rate dependence of red cell aggregation in vitro," *J Clin Invest*, vol. 47, pp. 1447-1454, Jun 1968.
- [15] Y. W. Yuan and K. K. Shung, "Ultrasonic backscatter from flowing whole blood. I: Dependence on shear rate and hematocrit," *J Acoust Soc Am*, vol. 84, pp. 52-8, Jul 1988.
- [16] J. Machi, B. Sigel, J. C. Beittler, J. C. Coelho, and J. R. Justin, "Relation of in vivo blood flow to ultrasound echogenicity," *J Clin Ultrasound*, vol. 11, pp. 3-10, Jan 1983.
- [17] S. Forconi, M. Guerrini, P. Ravelli, C. Rossi, C. Ferrozzi, S. Pecchi, and G. Biasi, "Arterial and venous blood viscosity in ischemic lower limbs in patients affected by peripheral obliterative arterial disease," *J Cardiovasc Surg (Torino)*, vol. 20, pp. 379-84, Jul-Aug 1979.
- [18] X. Weng, G. Cloutier, P. Pibarot, and L. G. Durand, "Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf, and normal human blood," *Biorheology*, vol. 33, pp. 365-77, Jul-Oct 1996.
- [19] O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, *Handbook of hemorheology and hemodynamics*. Amsterdam: IOS Press, 2007.

- [20] E. Tugral, O. Yalcin, and O. K. Baskurt, "Effect of donor age on the deformability and aggregability of density-separated red blood cells," *Turk J Haematol*, vol. 19, pp. 303-8, 2002.
- [21] B. Pignon, D. Jolly, G. Potron, B. Lartigue, J. P. Vilque, P. Nguyen, J. C. Etienne, and J. F. Stoltz, "Erythrocyte aggregation--determination of normal values. Influence of age, sex, hormonal state, oestroprogestative treatment, haematological parameters and cigarette smoking," *Nouv Rev Fr Hematol*, vol. 36, pp. 431-9, Dec 1994.
- [22] G. Cloutier, X. Weng, G. O. Roederer, L. Allard, F. Tardif, and R. Beaulieu, "Differences in the erythrocyte aggregation level between veins and arteries of normolipidemic and hyperlipidemic individuals," *Ultrasound Med Biol*, vol. 23, pp. 1383-93, 1997.
- [23] S. M. Razavian, M. Del Pino, A. Simon, and J. Levenson, "Increase in erythrocyte disaggregation shear stress in hypertension," *Hypertension*, vol. 20, pp. 247-52, Aug 1992.
- [24] M. Poggi, G. Palareti, R. Biagi, C. Legnani, M. Parenti, A. C. Babini, L. Baraldi, and S. Coccheri, "Prolonged very low calorie diet in highly obese subjects reduces plasma viscosity and red cell aggregation but not fibrinogen," *Int J Obes Relat Metab Disord*, vol. 18, pp. 490-6, Jul 1994.
- [25] M. Hayakawa and F. Kuzuya, "Effects of ticlopidine on erythrocyte aggregation in thrombotic disorders," *Angiology*, vol. 42, pp. 747-53, Sep 1991.
- [26] G. Caimi, B. Canino, A. Romano, A. Catania, and R. Lo Presti, "Erythrocyte aggregation and erythrocyte membrane properties in type 2 diabetes mellitus and in vascular atherosclerotic disease," *Thromb Haemost*, vol. 83, pp. 516-7, Mar 2000.
- [27] A. Chabanel, M. H. Horellou, J. Conard, and M. M. Samama, "Red blood cell aggregability in patients with a history of leg vein thrombosis: influence of post-thrombotic treatment," *Br J Haematol*, vol. 88, pp. 174-9, Sep 1994.
- [28] L. Dintenfass, *Blood microrheology - viscosity factors in blood flow, ischemia and thrombosis*. London: Butterworth & Co., 1971.
- [29] B. A. J. Angelsen, *Ultrasound imaging - waves, signals, and signal processing*. Norway: Emantec, 2000.
- [30] B. J. Oosterveld, J. M. Thijssen, P. C. Hartman, R. L. Romijn, and G. J. Rosenbusch, "Ultrasound attenuation and texture analysis of diffuse liver disease: methods and preliminary results," *Phys Med Biol*, vol. 36, pp. 1039-64, Aug 1991.
- [31] C. Guittet, F. Ossant, J. P. Remenieras, L. Pourcelot, and M. Berson, "High-frequency estimation of the ultrasonic attenuation coefficient slope obtained in human skin: simulation and in vivo results," *Ultrasound Med Biol*, vol. 25, pp. 421-9, Mar 1999.
- [32] J. M. Thijssen, B. J. Oosterveld, P. C. Hartman, and G. J. Rosenbusch, "Correlations between acoustic and texture parameters from RF and B-mode liver echograms," *Ultrasound Med Biol*, vol. 19, pp. 13-20, 1993.
- [33] Y. W. Yuan and K. K. Shung, "Ultrasonic backscatter from flowing whole blood. II: Dependence on frequency and fibrinogen concentration," *J Acoust Soc Am*, vol. 84, pp. 1195-200, Oct 1988.
- [34] I. Fontaine and G. Cloutier, "Modeling the frequency dependence (5-120 MHz) of ultrasound backscattering by red cell aggregates in shear flow at a normal hematocrit," *J Acoust Soc Am*, vol. 113, pp. 2893-900, May 2003.
- [35] G. Cloutier, M. Daronatand, D. Savery, D. Garcia, L. G. Durand, and F. S. Foster, "Non-Gaussian statistics and temporal variations of the ultrasound signal backscattered by blood at frequencies between 10 and 58 MHz," *J Acoust Soc Am*, vol. 116, pp. 566-77, Jul 2004.
- [36] L. C. Nguyen, F. T. Yu, and G. Cloutier, "Cyclic Changes in Blood Echogenicity Under Pulsatile Flow Are Frequency Dependent," *Ultrasound Med Biol*, vol. 34, pp. 664-673, Apr 2008.
- [37] B. Sigel, J. Machi, J. C. Beitler, J. R. Justin, and J. C. Coelho, "Variable ultrasound echogenicity in flowing blood," *Science*, vol. 218, pp. 1321-3, Dec 24 1982.

- [38] S. H. Wang and K. K. Shung, "In vivo measurements of ultrasonic backscattering in blood," *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 48, pp. 425-31, Mar 2001.
- [39] V. Rouffiac, J. P. Guglielmi, A. Barbet, N. Lassau, and P. Peronneau, "Application of validated ultrasound indices to investigate erythrocyte aggregation in pigs. Preliminary in vivo results," *Ultrasound Med Biol*, vol. 30, pp. 35-44, Jan 2004.
- [40] H. Kitamura and S. Kawasaki, "Detection and clinical significance of red cell aggregation in the human subcutaneous vein using a high-frequency transducer (10 MHz): a preliminary report," *Ultrasound Med Biol*, vol. 23, pp. 933-8, 1997.
- [41] F. Yu, J. Gennisson, and G. Cloutier, "A new method to assess the kinetics of rouleaux formation in human subcutaneous veins using high frequency parametric imaging: preliminary results," in *IEEE Ultrasonic Symposium*, 2005, pp. 870-873.
- [42] J. Mayfield, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus: new criteria," *Am Fam Physician*, vol. 58, pp. 1355-62, 1369-70, Oct 15 1998.
- [43] G. Hennen, *Endocrinologie*. France: De Boeck Université, 2001.
- [44] S. P. Marso and W. R. Hiatt, "Peripheral arterial disease in patients with diabetes," *J Am Coll Cardiol*, vol. 47, pp. 921-9, Mar 7 2006.
- [45] M. T. Johnstone and A. Veves, *Diabetes and cardiovascular disease*, 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005.
- [46] "American Diabetes Association, Peripheral arterial disease in people with diabetes," *Diabetes Care*, vol. 26, pp. 3333-41, Dec 2003.
- [47] A. D. Association, "Peripheral arterial disease in people with diabetes," *Diabetes Care*, vol. 26, pp. 3333-41, Dec 2003.
- [48] B. L. Abramson, V. Huckell, S. Anand, T. Forbes, A. Gupta, K. Harris, A. Junaid, T. Lindsay, F. McAlister, A. Roussin, J. Saw, K. K. Teo, A. G. Turpie, and S. Verma, "Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference: peripheral arterial disease - executive summary," *Can J Cardiol*, vol. 21, pp. 997-1006, Oct 2005.
- [49] T. Puttemans and C. Nemery, "Diabetes: the use of color Doppler sonography for the assessment of vascular complications," *Eur J Ultrasound*, vol. 7, pp. 15-22, Feb 1998.
- [50] "American Diabetes Association, Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care: 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts.," *Diabetes Care*, vol. 22, pp. 1354-60, Aug 1999.
- [51] R. B. Rutherford, J. D. Baker, C. Ernst, K. W. Johnston, J. M. Porter, S. Ahn, and D. N. Jones, "Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version," *J Vasc Surg*, vol. 26, pp. 517-38, Sep 1997.
- [52] C. Le Devehat, M. Vimeux, G. Bondoux, and T. Khodabandehlou, "Red blood cell aggregation in diabetes mellitus," *Int Angiol*, vol. 9, pp. 11-5, Jan-Mar 1990.
- [53] T. Khodabandehlou and C. Le Devehat, "Aggregation of erythrocyte suspensions of diabetic patients in dextran 70 solutions," *J Mal Vasc*, vol. 17, pp. 107-11, 1992.
- [54] O. Ziegler, H. Candiloros, X. Derriennic, S. Muller, M. Donner, J. F. Stoltz, and P. Drouin, "Erythrocyte aggregation in diabetes mellitus: role of plasmatic and membrane factors," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 12, pp. 873-81, 1992.
- [55] O. Ziegler, B. Guerci, S. Muller, H. Candiloros, L. Mejean, M. Donner, J. F. Stoltz, and P. Drouin, "Increased erythrocyte aggregation in insulin-dependent diabetes mellitus and its relationship to plasma factors: a multivariate analysis," *Metabolism*, vol. 43, pp. 1182-6, Sep 1994.
- [56] C. Le Devehat, T. Khodabandehlou, M. Vimeux, and F. Aouane, "Diabetes mellitus: its effects on blood rheological properties and microcirculatory consequences," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 16, pp. 677-83, 1996.
- [57] C. Le Devehat, T. Khodabandehlou, and M. Vimeux, "Diabetes mellitus and fibrinogen. Hemorrheological and microcirculatory consequences," *J Mal Vasc*, vol. 25, pp. 53-7, Feb 2000.

- [58] G. Cloutier, A. Zimmer, F. T. Yu, and J. L. Chiasson, "Increased shear rate resistance and fastest kinetics of erythrocyte aggregation in diabetes measured with ultrasound," *Diabetes Care*, vol. 31, pp. 1400-2, Jul 2008.
- [59] M. Mantskava, N. Momtselidze, N. Pargalava, and G. McHedlishvili, "Hemorheological disorders in patients with type 1 or 2 diabetes mellitus and foot gangrene," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 35, pp. 307-10, 2006.
- [60] R. Giansanti, M. Boemi, R. A. Rabini, L. Amodio, P. Fioravanti, F. Romagnoli, and P. Fumelli, "Haemorheological profile and retinopathy in patients with diabetic foot ulcer," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 15, pp. 73-80, 1995.
- [61] N. Pargalava, M. Mantskava, and G. McHedlishvili, "Regional and systemic hemorheological disorders during feet diabetic gangrene," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 30, pp. 457-9, 2004.
- [62] P. N. Demacker, A. G. Hijmans, B. J. Brennkmeijer, A. P. Jansen, and A. van 't Laar, "Five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol compared," *Clin Chem*, vol. 30, pp. 1797-800, Nov 1984.
- [63] T. Khodabandehlou, C. Le Devehat, and S. M. Razavian, "Impaired function of fibrinogen: consequences on red cell aggregation in diabetes mellitus," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 16, pp. 303-12, 1996.
- [64] R. M. Bauersachs, R. Wenby, and H. J. Meiselman, "Determination of specific red blood cell aggregation indices via an automated system," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 9, pp. 1-25, 1989.
- [65] G. Cloutier, Z. Qin, L. G. Durand, and B. G. Teh, "Power Doppler ultrasound evaluation of the shear rate and shear stress dependences of red blood cell aggregation," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 43, pp. 441-50, May 1996.
- [66] A. Heimdal, "Ultrasound Doppler measurements of low velocity blood flow: limitations due to clutter signals from vibrating muscles," *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 44, pp. 873-81, July 1997 1997.
- [67] E. Franceschini, F. T. Yu, and G. Cloutier, "Simultaneous estimation of attenuation and structure parameters of aggregated red blood cells from backscatter measurements," *J Acoust Soc Am*, vol. 123, pp. EL85-91, Apr 2008.
- [68] K. K. Shung and G. A. Thieme, *Ultrasonic scattering in biological tissues*. Florida: CRC Press, 1993.
- [69] F. T. Yu and G. Cloutier, "Experimental ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the structure factor size estimator," *J Acoust Soc Am*, vol. 122, pp. 645-56, Jul 2007.
- [70] J. J. Bishop, P. R. Nance, A. S. Popel, M. Intaglietta, and P. C. Johnson, "Relationship between erythrocyte aggregate size and flow rate in skeletal muscle venules," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 286, pp. H113-20, Jan 2004.
- [71] S. Tesfaye, R. Malik, and J. D. Ward, "Vascular factors in diabetic neuropathy," *Diabetologia*, vol. 37, pp. 847-54, Sep 1994.
- [72] M. E. Edmonds, V. C. Roberts, and P. J. Watkins, "Blood flow in the diabetic neuropathic foot," *Diabetologia*, vol. 22, pp. 9-15, Jan 1982.
- [73] S. Tesfaye, N. Harris, J. J. Jakubowski, C. Mody, R. M. Wilson, I. G. Rennie, and J. D. Ward, "Impaired blood flow and arterio-venous shunting in human diabetic neuropathy: a novel technique of nerve photography and fluorescein angiography," *Diabetologia*, vol. 36, pp. 1266-74, Dec 1993.
- [74] E. Mudge, "The role of microvascular disease in diabetic foot ulceration," *The Diabetic foot*, vol. 5, 2002.
- [75] A. W. Stitt, H. R. Anderson, T. A. Gardiner, and D. B. Archer, "Diabetic retinopathy: quantitative variation in capillary basement membrane thickening in arterial or venous environments," *Br J Ophthalmol*, vol. 78, pp. 133-7, Feb 1994.

- [76] K. Malanin, P. J. Kolari, and V. K. Havu, "The role of low resistance blood flow pathways in the pathogenesis and healing of venous leg ulcers," *Acta Derm Venereol*, vol. 79, pp. 156-60, Mar 1999.
- [77] H. C. Chen, R. S. Newsom, V. Patel, J. Cassar, H. Mather, and E. M. Kohner, "Retinal blood flow changes during pregnancy in women with diabetes," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 35, pp. 3199-208, Jul 1994.
- [78] W. J. Zwiebel and J. S. Pellerito, *Introduction to vascular ultrasonography, 5th Edition*, Elsevier Saunders ed. Philadelphia, 2005.
- [79] D. O. Corbin, R. J. Young, D. C. Morrison, P. Hoskins, W. N. McDicken, E. Housley, and B. F. Clarke, "Blood flow in the foot, polyneuropathy and foot ulceration in diabetes mellitus," *Diabetologia*, vol. 30, pp. 468-73, Jul 1987.
- [80] C. Guittet, F. Ossant, L. Vaillant, and M. Berson, "In vivo high-frequency ultrasonic characterization of human dermis," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 46, pp. 740-6, Jun 1999.
- [81] B. I. Raju and M. A. Srinivasan, "High-frequency ultrasonic attenuation and backscatter coefficients of in vivo normal human dermis and subcutaneous fat," *Ultrasound Med Biol*, vol. 27, pp. 1543-56, Nov 2001.
- [82] M. J. Goodfield and L. G. Millard, "The skin in diabetes mellitus," *Diabetologia*, vol. 31, pp. 567-75, Aug 1988.
- [83] J. J. Bishop, A. S. Popel, M. Intaglietta, and P. C. Johnson, "Rheological effects of red blood cell aggregation in the venous network: a review of recent studies," *Biorheology*, vol. 38, pp. 263-74, 2001.
- [84] C. A. Dujovne, W. S. Harris, R. Altman, R. W. Overhiser, and D. M. Black, "Effect of atorvastatin on hemorheologic-hemostatic parameters and serum fibrinogen levels in hyperlipidemic patients," *Am J Cardiol*, vol. 85, pp. 350-3, Feb 1 2000.
- [85] C. Otto, M. M. Ritter, A. C. Soennichsen, P. Schwandt, and W. O. Richter, "Effects of n-3 fatty acids and fenofibrate on lipid and hemorrheological parameters in familial dysbetalipoproteinemia and familial hypertriglyceridemia," *Metabolism*, vol. 45, pp. 1305-11, Oct 1996.
- [86] A. V. Muravyov, L. G. Zaitsev, A. A. Muravyov, V. V. Yakusevich, and A. M. Sirotkina, "Effects of Ramipril and Isradipin on hemorheological profiles in patients with arterial hypertension," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 18, pp. 185-90, Jul 1998.
- [87] A. V. Muravyov, V. V. Yakusevich, A. V. Kabanov, and A. S. Petrochenko, "The effect of diuretics on red blood cell microrheological parameters in female hypertensive patients," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 33, pp. 121-6, 2005.
- [88] W. Koenig and E. Ernst, "The effects of calcium channel blockers on blood fluidity," *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 16 Suppl 6, pp. S40-4, 1990.
- [89] M. A. Boogaerts, C. Roelant, J. Temmerman, W. Goossens, and R. L. Verwilghen, "Effect of beta-blocking drugs on red cell adhesive and rheological properties," *J Lab Clin Med*, vol. 102, pp. 899-908, Dec 1983.
- [90] L. Coppola, G. Verrazzo, C. La Marca, P. Ziccardi, A. Grassia, A. Tirelli, and D. Giugliano, "Effect of insulin on blood rheology in non-diabetic subjects and in patients with Type 2 diabetes mellitus," *Diabet Med*, vol. 14, pp. 959-63, Nov 1997.
- [91] N. Tanahashi, M. Tomita, M. Kobari, H. Takeda, M. Yokoyama, and Y. Fukuuchi, "Aspirin improves the enhanced erythrocyte aggregability in patients with cerebral infarction," *J Neurol Sci*, vol. 139, pp. 137-40, Jul 1996.
- [92] J. Vekasi, K. Koltai, V. Gaal, A. Toth, I. Juricskay, and G. Kesmarky, "The effect of aspirin on hemorheological parameters of patients with diabetic retinopathy," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 39, pp. 385-9, 2008.
- [93] H. Larsson, S. Valdemarsson, P. Hedner, and H. Odeberg, "Reversal of increased whole blood and plasma viscosity after treatment of hypothyroidism in man," *Acta Med Scand*, vol. 217, pp. 67-72, 1985.

- [94] G. E. Trahey, J. W. Allison, and O. T. von Ramm, "Angle independent ultrasonic detection of blood flow," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 34, pp. 965-7, Dec 1987.
- [95] A. Guinier and G. Fournet, *Small-angle scattering of X-rays*. New York: John Wiley & Sons, 1955.

ANNEXES

Annexe A Calculs de la vitesse en mode Doppler

Cette annexe explique plus en détails les calculs obtenus par la sonde Doppler pour estimer une vitesse dans un vaisseau sanguin.

Comme mentionné dans la revue de la littérature à la section 2.2.2.2, la différence entre la fréquence de l'onde incidente (f_i) et celle de l'onde réfléchie (f_r) s'exprime par

$$\Delta f = f_i - f_r \quad (\text{eqn A.1})$$

La relation liant la différence de fréquence (Δf) et la vitesse (v) de la particule est la suivante :

$$v = \frac{c \times \pm \Delta f}{2 f_i \cos \theta} \quad (\text{eqn A.2})$$

Nous pouvons donc schématiser l'eqn A.2 par la **figure A.1**. Ainsi, le spectre Doppler est obtenu en faisant la soustraction de la transformée de Fourier (TF) du signal incident et du signal reçu. La fréquence du spectre est alors centrée à une valeur Δf . Pour des images bidimensionnelles, le spectre est calculé sur un volume d'échantillon (**Figure A.2 (a)**), donc les spectres à chaque profondeur sont superposés (**Figure A.2 (b)**). Ensuite, le spectre est tourné de 90 degrés (**Figure A.2 (c)**) et la fréquence centrale est représentée sur l'axe temporel (**Figure A.2 (d)**). Finalement, la vitesse est calculée à partir de l'eqn A.2. Ces étapes sont ensuite recommencées pour toutes les intervalles de temps afin d'afficher un tracé des spectres en fonction du temps.

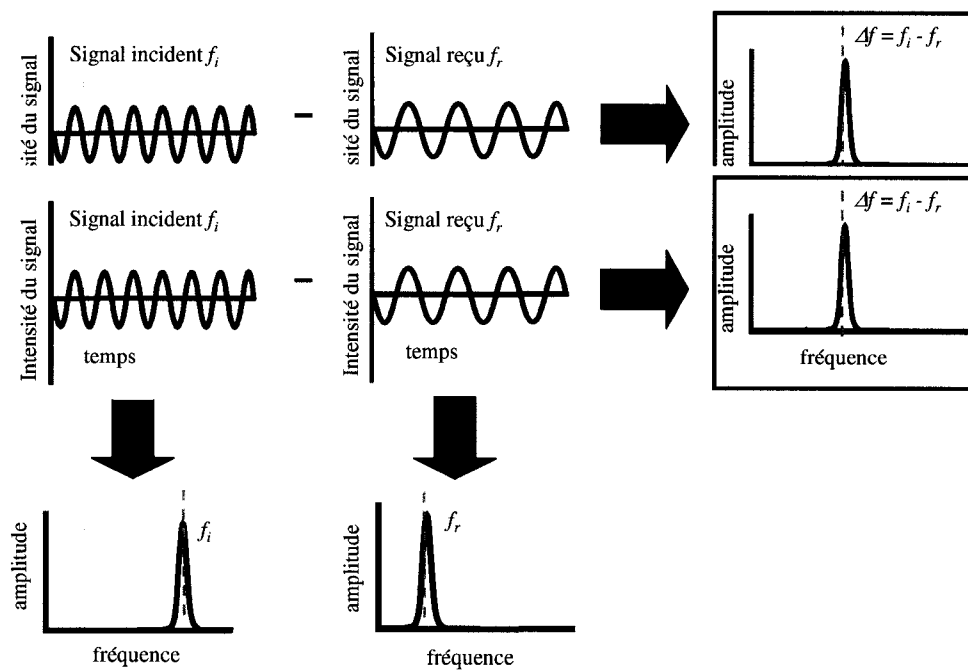


Figure A.1 : Différence des spectres du signal transmis et reçu (encadré rouge)
(tirée de [12])

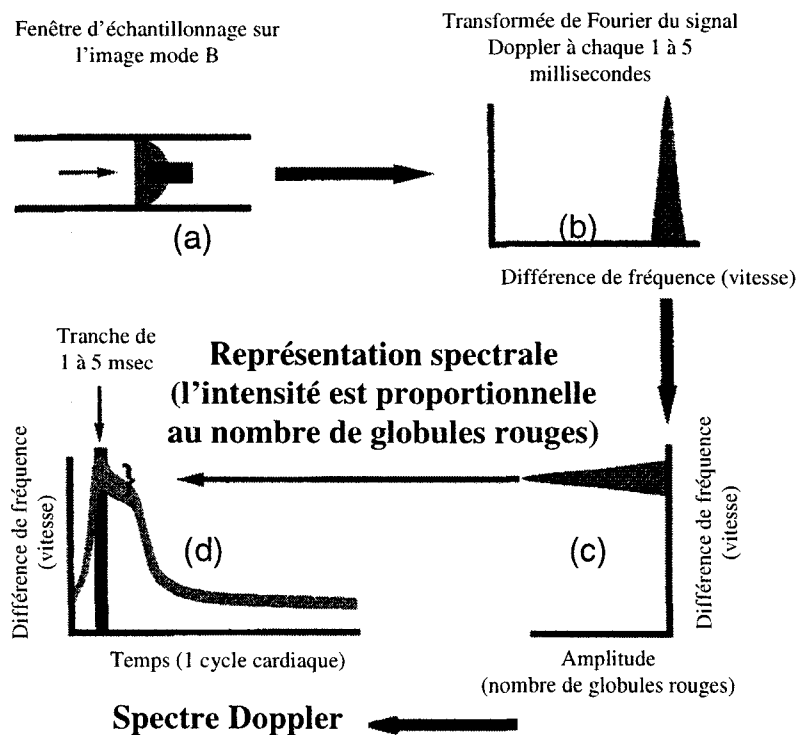


Figure A.2 : (a) Volume d'échantillon sur l'image mode B ; (b) et (c) Spectres Doppler obtenus en appliquant une différence de fréquence, (d) Portion du spectre représentée sur l'échelle temporelle.

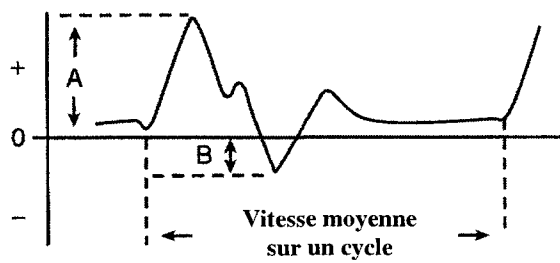
(tirée de [12])

Annexe B

Calculs des index de vitesse pour les artères

Cette annexe donne les détails des calculs des index de vitesse obtenus pour les artères.

A.1 Calcul de l'index de pulsativité (*PI, Pulsatility index*)



$$PI = \frac{A - B}{V_{moyenne}}$$

(tirée de [78])

A.2 Calcul de l'index de résistance (*RI, Resistivity index*)



$$RI = \frac{A - B}{A}$$

(tirée de [78])

Annexe C

Approximation du facteur de structure

Cette annexe donne les développements détaillés de l'approximation utilisée pour calculer le facteur de structure [69].

Le facteur de structure $S(k)$, qui en réalité s'écrit $S(-2k)$ ¹⁷, dépend de la transformée de Fourier de la fonction $g(r)$ qui représente la probabilité de trouver deux particules séparés d'une distance r .

$$S(-2k) = 1 + m \int (g(r) - 1) e^{-2jkr} dr \quad (\text{eqn C.1})$$

En faisant un développement de Taylor de second ordre, nous obtenons la forme suivante

$$S(-2k) \approx C_0 + (-2k)C_1 + (-2k)^2 C_2 \quad (\text{eqn C.2})$$

où C_i représente des constantes du polynôme. Or par définition,

$$C_0 = S(k) \big|_{k=0} = 1 + m \int (g(r) - 1) dr = W \quad (\text{eqn C.3})$$

où W est le facteur d'empaquetage. Dans cette même eqn C.2,

$$C_1 = 0 \quad (\text{eqn C.4})$$

¹⁷ Ici, $S(k)$ ou $S(-2k)$ est une question de notation. $S(k)$ s'exprime en fonction de k qui est l'onde incidente, et $S(-2k)$ s'exprime en fonction de $-2k$ qui est l'onde rétrodiffusée. Dans le cas de l'onde rétrodiffusée, on définit un vecteur $q = k_s - k$, où k_s est l'onde diffusée et k , l'onde incidente. Pour la rétrodiffusion où l'on s'intéresse à l'onde diffusée à un angle de 180° , $k_s = -k$, ce qui donne $q = -2k$.

à cause de la parité, en effet $C_1 = 0$ pour que $S(k) = S(-k)$, c'est-à-dire que si l'échantillon de sang est tourné de 180 degrés, $S(k)$ doit rester le même. Quant au paramètre C_2 , celui-ci vaut

$$C_2 = -R_g^2 \quad (\text{eqn C.5})$$

où R_g représente le rayon de gyration d'un agrégat tridimensionnel. Or selon la littérature [95],

$$R_g = \sqrt{\frac{3}{5}}R \quad (\text{eqn C.6})$$

où R est le rayon d'un agrégat considéré isotrope.

En remplaçant l'eqn C.2 par les constantes C_i , nous obtenons l'approximation suivante pour le facteur de structure

$$S(k) = W - \frac{12}{5}(kR)^2 \quad (\text{eqn C.7})$$

Annexe D

Résultats détaillés des paramètres *in vivo*

Cette annexe montre les valeurs détaillées des paramètres *in vivo* D et W calculés par la méthode SFSAE ainsi que le taux de cisaillement estimés dans la veine.

Tableau D.1 : Paramètres d'agrégation *in vivo* obtenus pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 25 MHz

Vaisseau	Paramètres	Diabétiques (N=10)	Témoins (N=10)
	$\bar{\gamma}$ (s ⁻¹)	69,3 ± 64,6	24,8 ± 24,5 **
		méd = 46,5 min = 23,0 max = 230,0	méd = 20,0 min = 4,0 max = 70,0
CEP	D (sans unité)	2,04 ± 1,84	1,03 ± 0,68
		méd = 1,17 min = 0,65 max = 6,03	méd = 0,84 min = 0,23 max = 2,19
	W (sans unité)	3,00 ± 5,24	0,62 ± 0,68
		méd = 0,50 min = 0,42 max = 15,14	méd = 0,29 min = 0,04 max = 2,10
	$\bar{\gamma}$ (s ⁻¹)	51,7 ± 29,6	21,6 ± 26,6 *
		méd = 51,0 min = 8,0 max = 109,0	méd = 10,5 min = 5,0 max = 91,0
SAI	D (sans unité)	1,91 ± 1,30	1,55 ± 0,95
		méd = 1,67 min = 0,58 max = 4,51	méd = 1,50 min = 0,23 max = 3,49
	W (sans unité)	1,28 ± 1,62	0,92 ± 1,12
		méd = 0,61 min = 0,18 max = 5,20	méd = 0,49 min = 0,03 max = 3,87

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test de U Mann-Whitney)

CEP : veine céphalique (bras); SAI : veine saphène interne (pied); $\bar{\gamma}$: taux de cisaillement moyen; D : index de taille d'agrégats; W : le facteur d'empaquetage; méd : médiane; min : minimum; max : maximum,

Tableau D.2 : Paramètres d'agrégation *in vivo* obtenus pour la veine céphalique du bras (CEP) et la veine saphène interne du pied (SAI) à 35 MHz

Vaisseau	Paramètres	Diabétiques (N=10)	Témoins (N=10)
CEP	$\bar{\gamma}$ (s^{-1})	69,3 ± 64,6 méd = 46,5 min = 23,0 max = 230,0	24,8 ± 24,5 ** méd = 20,0 min = 4,0 max = 70,0
	D (sans unité)	1,00 ± 0,63 méd = 0,84 min = 0,29 max = 2,48	0,73 ± 0,35 méd = 0,65 min = 0,32 max = 1,21
	W (sans unité)	0,69 ± 0,78 méd = 0,46 min = 0,13 max = 2,78	0,33 ± 0,23 méd = 0,24 min = 0,07 max = 0,74
	$\bar{\gamma}$ (s^{-1})	51,7 ± 29,6 méd = 51,0 min = 8,0 max = 109,0	21,6 ± 26,6 * méd = 10,5 min = 5,0 max = 91,0
	D (sans unité)	1,11 ± 0,81 méd = 0,88 min = 0,34 max = 3,06	1,15 ± 0,52 méd = 1,02 min = 0,56 max = 2,02
	W (sans unité)	0,71 ± 0,92 méd = 0,33 min = 0,16 max = 3,19	0,63 ± 0,55 méd = 0,67 min = 0,08 max = 1,98

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test de U Mann-Whitney)

CEP : veine céphalique (bras); SAI : veine saphène interne (pied); $\bar{\gamma}$: taux de cisaillement moyen; D : index de taille d'agrégats; W : le facteur d'empaquetage; méd : médiane; min : minimum; max : maximum