
Population

Les expériences ont été réalisées sur un total de 190 rats mâles de souche Wistar âgés de 16 semaines. Le bon état de santé des animaux était garanti à chaque livraison par un certificat sanitaire. Les expérimentations se sont déroulées de septembre 2007 à Mai 2010 au sein des locaux de l'EA:4278 (Avignon, dirigé par le Pr Philippe Obert) ainsi qu'au sein des locaux de l'U637 pour la partie cellulaire au sein (Montpellier, dirigé par le Dr Sylvain Richard) et des locaux de l'UMR5525, TIMC-IMAG équipe PRETA/Cœur & Nutrition, pour certains dosages biochimiques (Grenoble, dirigé par le Pr Joël de Leiris). Les animaux ont été placés dans des conditions standards de température et d'humidité et éclairés selon un rythme 12 heures de jour/12 heures de nuit. L'accès à l'eau et à la nourriture était libre.

Ce travail est organisé et présenté selon 3 études distinctes. Pour les études 1 et 2, les rats ont été aléatoirement répartis en début de protocole dans les 2 groupes suivants :

- Rats Ctrl : rats placés en environnement standard d'animalerie (Air filtré standard)
- Rats CO : rats placés 12 heures par jour en environnement pollué au CO (30-100 ppm) et 12 heures en environnement standard d'animalerie, pendant 4 semaines.

Pour l'étude 3, afin d'évaluer les effets potentiellement protecteurs d'un entraînement conduit dans les semaines précédant l'exposition à un environnement pollué, les rats ont été répartis aléatoirement dans les 3 groupes suivants :

- Rats Ctrl-Sed : rats placés en environnement standard d'animalerie
- Rats CO-Sed : rats placés 12 heures par jour en environnement pollué au CO (30-100 ppm) et 12 heures en environnement standard d'animalerie, pendant 4 semaines.

- Rats CO-Ex : rats entraînés, en environnement standard d'animalerie, 5 jours par semaine pendant 4 semaines, puis 2 jours par semaine pendant les 4 semaines d'exposition en environnement pollué au CO (cf. exposition des rats CO, II.).

Toutes les expériences ont été menées en accord avec les directives du ministère français de l'agriculture et les conventions européennes sur l'utilisation et le conditionnement des animaux de laboratoire.

II. Exposition au CO

L'OMS a estimé des seuils d'exposition au CO au-delà desquels la santé de l'individu est mise en cause. Des expositions à 9 ppm pendant 8 heures constituent une limite recommandée à ne pas dépasser. Cependant il existe des périodes de la journée, où ces concentrations sont largement supérieures en milieu urbain. En effet, différentes enquêtes portant sur la qualité de l'air rapportent des concentrations allant de 2 à 40 ppm mais pouvant atteindre 170 ppm en cas de trafic important (Wright et al., 1975 ; Stern et al., 1988 ; Bevan et al., 1991 ; Finkelstein et al., 2005). Ainsi, de manière à simuler une exposition de type citadine au CO, les animaux ont été placés 12 heures par jour dans un caisson hermétique relié à une bouteille de CO. La concentration en CO au sein du caisson était contrôlée en continu à l'aide d'un analyseur de CO de type CHEMGARD Infrared Gas Monitor NEMA 4 Version, (MSA) et régulé grâce à un système d'électrovanne dont l'ouverture et la fermeture étaient contrôlées par informatique. Les rats ont été exposés à une concentration résiduelle de 30 ppm complétée par 5 pics de 1 heure à 100 ppm. Ils étaient ensuite placés 12 heures en environnement standard d'animalerie (air filtré standard d'animalerie, AFS) (Figure 21).

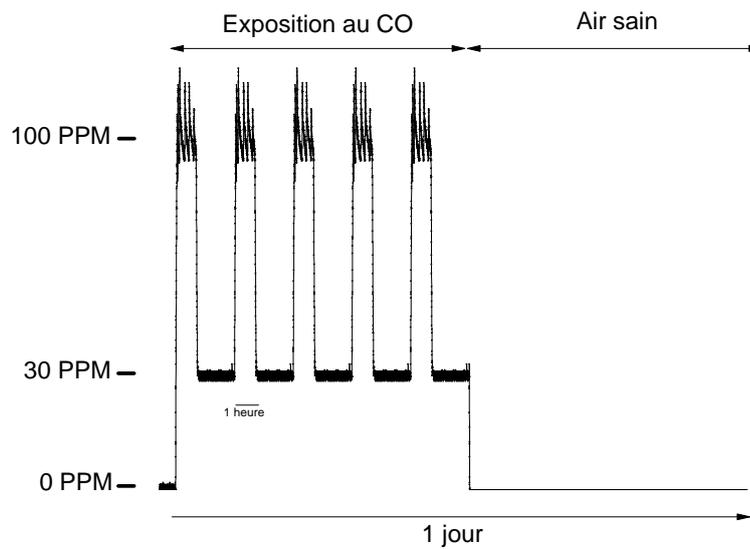


Figure 21 : Pattern type d'exposition au CO (24 heures).

Afin d'éviter tout effet aigu du CO au cours des expérimentations, les rats étaient placés, à la fin des 4 semaines d'exposition, 24 heures en environnement AFS avant d'être utilisés pour les expériences. En effet, des travaux préliminaires ont montré que les concentrations d'HbCO, supérieures chez les rats CO par rapport aux rats Ctrl 1 heure et 3 heures après la dernière exposition, ne diffèrent pas entre les 2 groupes 24 heures après la sortie du caisson d'exposition (Figure 22).

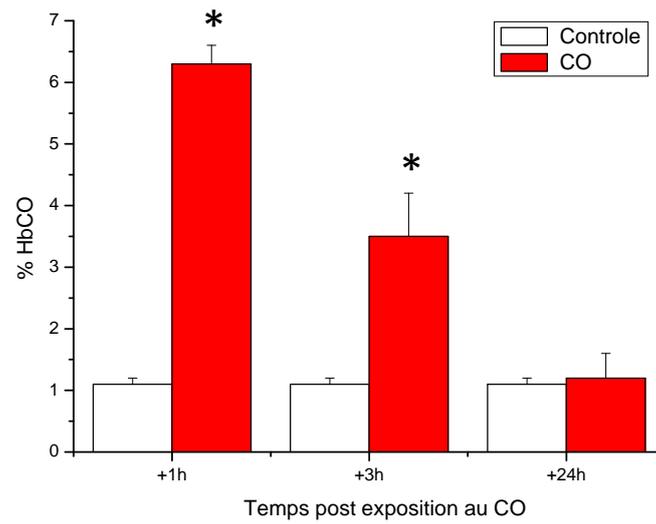


Figure 22 : Evolution des taux d'HbCO sanguine suite au protocole d'exposition au CO, * $p < 0,05$; rats CO vs. Ctrl.

III. Entraînement en endurance

Selon les recommandations de l’OMS, l’activité physique régulière, définit comme la pratique d’une activité d’une durée minimum de 30 min à intensité modérée au moins 5 jours par semaine (OMS et FIMS, 1995) est bénéfique pour la santé. Partant de ces recommandations, un protocole d’entraînement en endurance à intensité modérée a été mis en œuvre. Ce protocole a été conduit en environnement AFS durant les 4 semaines précédant la période d’exposition au CO à raison de 5 séances consécutives par semaine et les exercices ont été réalisés sur tapis roulant motorisé (Image 1). Durant la première semaine, les animaux étaient familiarisés au tapis roulant avec une première séance de 15 min à une vitesse de 17 m/min. Chaque jour, une augmentation du temps de course de 5 min était réalisée afin d’atteindre 40 min de course en fin de semaine. Les semaines suivantes, chaque séance durait 40 min de course à une vitesse de 17 m/min, puis 18 m/min la troisième semaine, et 20 m/min la dernière semaine. Durant toute la durée du protocole, chaque séance débutait par un échauffement de 5 min à 10 m/min, avec une augmentation progressive de la vitesse jusqu’à atteindre celle requise pour l’entraînement. L’intensité d’effort était estimée tout au long du protocole à environ 50 % de la vitesse maximale aérobie (VMA) des animaux. A l’issue du programme d’entraînement, les rats CO-Ex maintenaient, lors des 4 semaines d’exposition au CO, un entraînement en condition AFS identique à celui réalisé lors de la dernière semaine du protocole d’entraînement, mais à raison de 2 séances par semaine uniquement (Figure 23).



Image 1 : Entraînement de rats sur tapis roulant

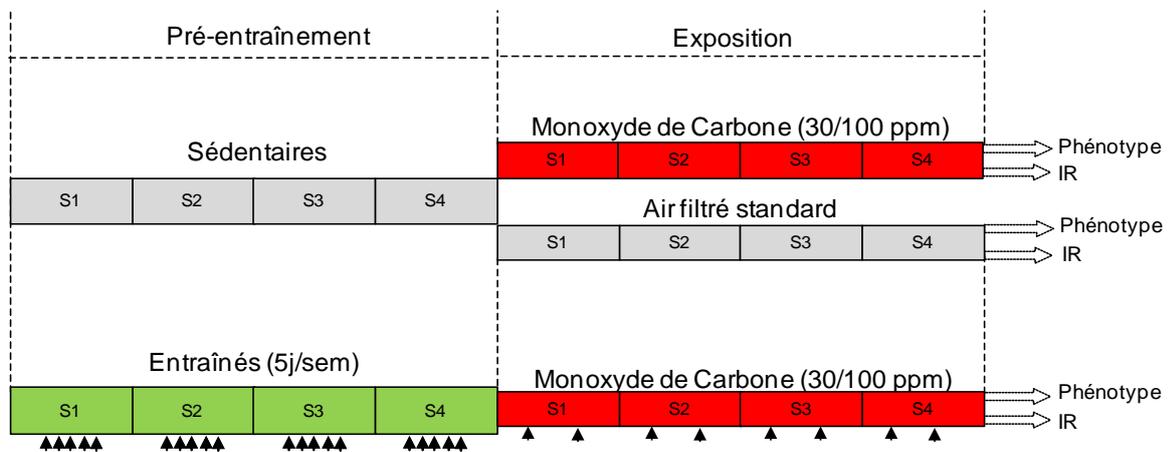


Figure 23 : Organisation du protocole d'entraînement et d'exposition au CO.

IV. Ischémie-reperfusion myocardique

Afin d'évaluer spécifiquement les effets d'une exposition chronique au CO sur le myocarde et ainsi de limiter l'influence des différents facteurs circulants possiblement modifiés par une exposition à ce polluant, le protocole d'IR a été réalisé sur un modèle de cœur isolé perfusé de Langendorff (Image 2).

Après une injection d'héparine (3000 UI/kg, i.p.), les rats étaient anesthésiés avec du pentobarbital sodique (50 mg/kg, i.p.). Une thoracotomie était réalisée, le cœur rapidement prélevé était immergé dans une solution de Krebs-Henseleit à 4°C afin de stopper toute activité contractile. L'aorte était canulée et le cœur perfusé de façon rétrograde, à pression constante (80 mmHg). Le dispositif de perfusion était constitué d'un réservoir de liquide relié à un piège à bulle et d'une enceinte thermostatée pour maintenir le liquide de perfusion à 37°C (Image 2). Le liquide de perfusion était une solution de Krebs-Henseleit composée de : NaCl 118.3, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Glucose 11.1, CaCl 2.5 ; mM. Cette solution était tamponnée à pH 7.4 et équilibrée par un mélange gazeux composé de 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂. La mesure du débit coronaire, tout au long du protocole, permettait d'évaluer la qualité du montage du cœur sur le système, et ainsi de s'assurer de la viabilité de l'organe tout au long du protocole.



Image 2 : Système de cœur isolé perfusé de Langendorff.

1. Fonction cardiaque et mort cellulaire au cours de l'IR.

Les atrioms gauche et droit étaient excisés et le nœud sinusal délicatement écrasé de manière à stopper la contraction autonome du cœur. Un ballonnet en latex, relié à un capteur de pression, était introduit dans le VG via les valves mitrales afin de mesurer la pression développée par ce dernier. Une fois le ballonnet introduit, le cœur était stimulé électriquement à une fréquence de 300 battements par minute. Le volume du ballonnet était ensuite ajusté afin que celui-ci adhère aux parois de la cavité, puis réglé afin d'obtenir et de maintenir une pression diastolique de 5 mmHg tout au long de la période de stabilisation. Afin de réaliser l'ischémie, un fil de suture (fil de soie 6-0) était placé autour de l'artère coronaire antérieure gauche (ACG). Au bout de 30 min de stabilisation, l'occlusion était réalisée en nouant le fil

de suture sur un tube en plastique placé à la surface du cœur, formant ainsi un point de compression sur l'artère. L'ischémie myocardique régionale était maintenue 30 min, puis le tube en plastique était retiré, permettant ainsi la reperfusion de la zone ischémisée. La reperfusion était maintenue pendant 2 heures.

A partir des tracés de pression, la pression développée (P_{dev} ; mmHg ; définie comme la différence entre la pression systolique et diastolique), ainsi que les dérivées maximales ($+dP/dt_{max}$; mmHg/s) et minimales ($-dP/dt_{max}$; mmHg/s) de pression ont été calculées tout au long du protocole d'IR (Figure 24).

La mesure du débit coronaire (ml/min) était réalisée par recueil et quantification des effluents coronaires tout au long du protocole de cœur isolé. La perfusion tissulaire était calculée à l'aide du rapport entre le poids du cœur et le débit coronaire (perfusion myocardique en ml/min/mg).

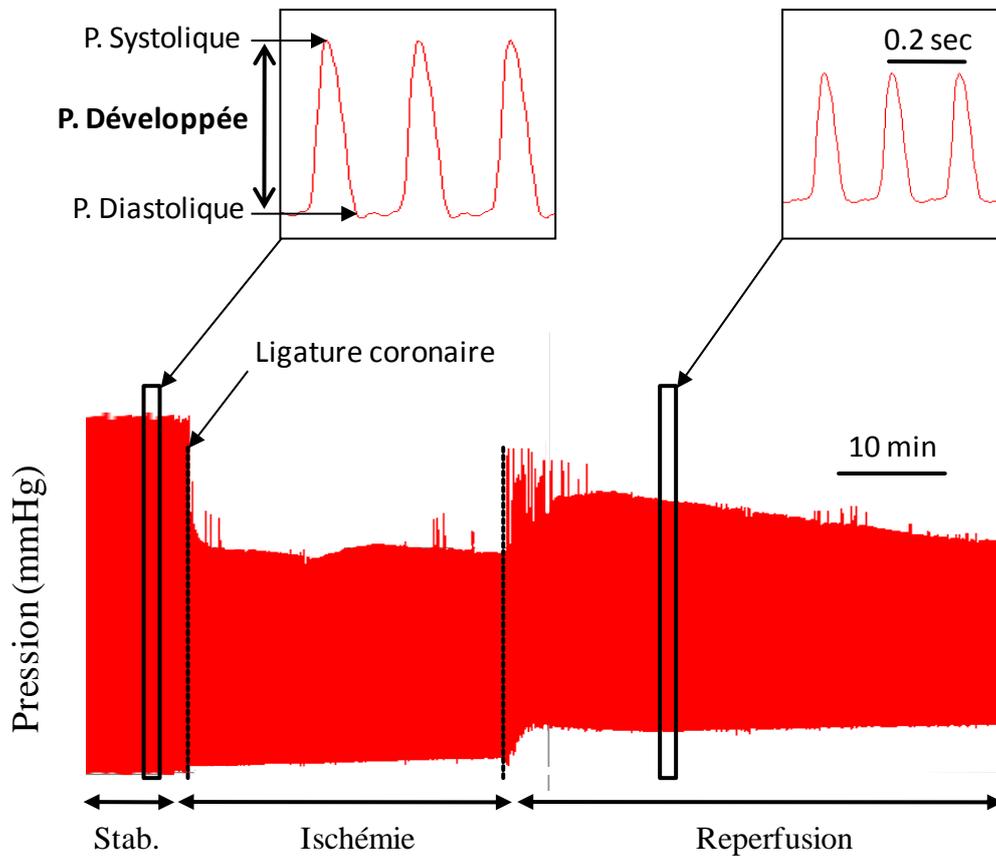


Figure 24 : Paramètres de pression au cours du protocole d'IR sur cœur isolé perfusé

Après 2 heures de reperfusion, le fil de suture était renoué de manière à obtenir une occlusion totale de la zone à risque (zone ischémisée). Une solution de Bleu d'Evans (5 ml, 2 %) était alors injectée progressivement afin de distinguer la zone perfusée (colorée en bleue) de la zone non perfusée ou zone à risque (non colorée) (Figure 25). Le cœur était ensuite congelé, puis ultérieurement découpé en 5 fines tranches (perpendiculairement à l'axe base-apex), incubées chacune pendant 25 min à 37°C dans une solution de triphenyl-tetrazolium chloride (TTC, 0.5 mg/ml). L'incubation dans le TTC permet de faire apparaître, en présence d'enzymes déshydrogénases, une coloration rouge brique du myocarde sain. Au contraire, dans les zones infarctées, caractérisées notamment par une absence d'activité enzymatique, aucune coloration n'est observée (blanc/brun) (Figure 25). Après coloration au TTC, les coupes de cœur étaient maintenues pendant 72 heures dans du Formol, puis analysées par

planimétrie (logiciel ImageJ, V1.28 image processing and analysis software from the National Health Institute, U.S.A.). La zone à risque était exprimée en pourcentage de la surface du cœur, et la zone infarctée était exprimée en pourcentage de la surface de la zone à risque.



Figure 25 : Evaluation planimétrique de la zone à risque et de la zone infarctée. En bleu : zone saine ; en rouge et blanc : zone à risque ; en blanc : zone infarctée.

2. Evaluation des arythmies de reperfusion.

Un protocole d'IR était réalisé sur cœur isolé battant afin d'évaluer les arythmies de reperfusion. Pour cela, une fois l'aorte canulée, le cœur était laissé intact et deux électrodes épiscopardiques (fil d'argent) étaient placées afin d'obtenir un tracé électrocardiographique (ECG). Les arythmies étaient évaluées durant les 4 premières min de reperfusion. L'analyse de l'ECG a permis d'évaluer différents types d'arythmies à partir de la classification décrite dans la convention de Lambeth (Walker et al., 1988) (Figure 26). Afin de comparer la sévérité des arythmies de reperfusion, un système de scorage adapté de celui décrit par Walker et al., (1988) était utilisé (Table 2). Les cœurs étaient notés selon un système graduel, rapporté dans la table 1, allant de 0 pour les cœurs ne présentant pas d'arythmie à 4 pour les cœurs présentant une fibrillation ventriculaire irréversible, complication rythmique considérée comme la plus grave.

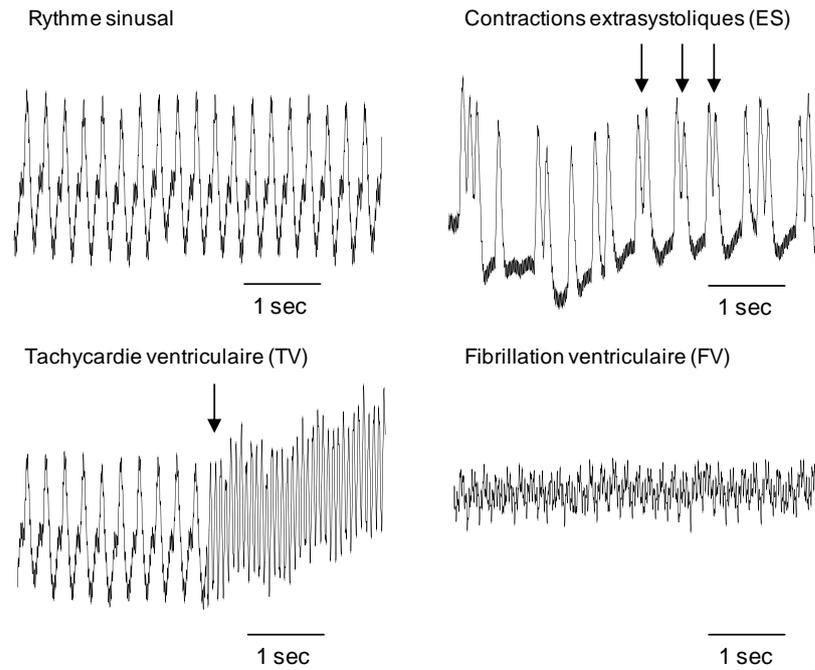


Figure 26 : Rythme sinusal et évènements arythmiques identifiés au cours de la reperfusion post-ischémique.

Tableau 2 : Système de scorage de la sévérité des arythmies de reperfusion post-ischémique, adapté de Walker et al., (1988).

Score d'arythmie

Score	Evènements arythmiques
0	Aucun évènement arythmique
1	ES uniquement
2	TV avec ou sans ES
3	FV réversible
4	FV irréversible

ES : extrasystole; TV : Tachycardie ventriculaire; FV : Fibrillation ventriculaire

V. Homéostasie calcique sur cardiomyocytes isolés

1. Isolement cellulaire

La procédure d'isolement cellulaire a été réalisée comme décrite par Andre et al., (2010). Brièvement, le cœur était prélevé et canulé sur un système de perfusion rétrograde de Langendorff, avec une solution Hanks-HEPES dépourvue de Ca^{2+} afin de fragiliser les connections intercellulaires (NaCl 117 ; KCL 5,7 ; NaHCO_3 4,4 ; KH_2PO_4 4,5 ; MgCl_2 1.7 ; HEPES 21 ; Glucose 11,7 ; Taurine 20, mM ; pH=7.5). Après 5 min de rinçage, le cœur était ensuite perfusé pendant 20 min avec une solution enzymatique contenant de la collagénase de type A (0,8 mg/mL), afin de digérer la matrice extracellulaire. Les cellules myocardiques étaient extraites mécaniquement à l'aide d'une pipette. La préparation était ensuite filtrée (Nylon 250 Mesh) pour éliminer les tissus non dissociés, et les cellules étaient incubées pendant 15 min à 37°C. Durant ces 15 min la concentration en Ca^{2+} était augmentée progressivement jusqu'à 1 mM. Les cellules reposaient alors 1 heure dans une solution physiologique à 1 mM Ca^{2+} .

2. Imagerie calcique et raccourcissement cellulaire

Le système Ionoptix (Boston, USA) permet d'étudier le couplage entre les mouvements calciques et le raccourcissement des sarcomères. La mesure de la longueur des sarcomères repose sur une propriété structurale intrinsèque des cardiomyocytes : l'alternance régulière des bandes claires (isotropes) et sombres (anisotropes) des protéines contractiles (actine et myosine). Cette alternance peut être assimilée à une fonction périodique de l'espace, analysée par une fonction

mathématique : la transformée de Fourier rapide (FFT). Cette fonction permet de transformer un signal périodique pur (de périodicité T) en une raie de fréquence dont la valeur fondamentale est $1/T$. L'analyse fréquentielle des sarcomères par la FFT donne un spectre de fréquences dont la valeur fondamentale est inversement proportionnelle à la distance moyenne entre deux sarcomères. L'acquisition et la mesure de la longueur des sarcomères étaient réalisées à l'aide du logiciel Ionoptix. L'analyse de la longueur des sarcomères s'effectuait à l'intérieur d'une fenêtre d'acquisition dont la position était choisie de telle sorte que l'on puisse avoir le maximum de sarcomères. L'analyse de l'image numérisée était effectuée toutes les 20 ms, durée inférieure à la durée moyenne de contraction des cellules cardiaques à température ambiante (22°C) qui est de plusieurs centaines de millisecondes. La résolution de la mesure de la longueur des sarcomères selon ce dispositif expérimental est de $\pm 7\text{ nm}$. Afin de mesurer les variations de Ca^{2+} intracellulaire, les cellules étaient incubées avec un indicateur calcique ratiométrique fluorescent, l'Indo-1AM, pendant 30 min ($50000\text{ cellules}/\mu\text{L}$ d'Indo). Après décantation, le surnageant était prélevé et remplacé par la solution physiologique d'une concentration calcique de $1,8\text{ mM}$. L'Indo-1AM est un fluorochrome utilisé en simple excitation (UV 360) et double émission (480 et 405 nm). La forme libre de l'Indo-1 émet à une fluorescence à 480 nm alors que la forme liée au Ca^{2+} émet à 405 nm. Ainsi quand la concentration intracellulaire augmente, l'amplitude du pic à 480 nm diminue, alors que celle du pic à 405 nm augmente. Le rapport F_{405}/F_{480} reflète la concentration de Ca^{2+} intracellulaire dans une gamme de concentration de 5 nM à $30\text{ }\mu\text{M}$, en minimisant les artéfacts de mouvement (Figure 27).

Les cellules placées dans la cuve de solution physiologique à $1,8\text{ mM Ca}^{2+}$ étaient stimulées électriquement à une fréquence de $0,5\text{ Hz}$ par des électrodes de platine. La longueur des sarcomères et la concentration en Ca^{2+} étaient mesurées en temps réel à l'aide du système Ionoptix (Boston, USA). La sonde était excitée par une lampe Xénon 75 W (XBO 75, 14 V) à 360 nm . Les signaux de fluorescence étaient collectés par deux photomultiplicateurs (PM1,

PM2, Hamamatsu R1104). L'acquisition et l'analyse des transitoires calciques ont été réalisées grâce au logiciel Ionoptix.

3. Paramètres mesurés

A partir de l'enregistrement du transitoire calcique et du raccourcissement cellulaire, étaient calculés : i) la fraction de raccourcissement cellulaire (pourcentage de variation de la longueur des sarcomères lors de la stimulation) ; ii) le Ca^{2+} basal, reflétant la concentration diastolique de Ca^{2+} cytosolique ; iii) l'amplitude du transitoire calcique, reflet de la quantité de Ca^{2+} libérée à chaque stimulation (différence entre le pic du transitoire et le niveau basal) ; iv) la vitesse de décroissance du Ca^{2+} cytosolique (Tau, temps de restauration de 50 % du Ca^{2+} basal), permettant d'apprécier la cinétique de repompage et d'élimination du Ca^{2+} cytosolique (Figure 7).

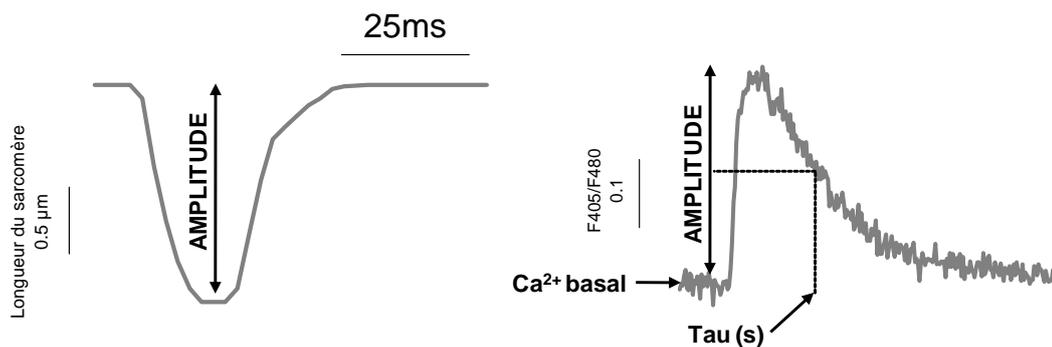


Figure 27 : Paramètres calculés : A. Raccourcissement cellulaire B. Transitoire calcique.

4. Protocole d'anoxie-reoxygénation cellulaire

Les cardiomyocytes une fois isolés étaient transférés dans une cuve et placés pendant 60 min dans une chambre d'anoxie où la concentration d'O₂ était d'environ 2 %; puis ces cuves étaient placées 60 min à air ambiant à une concentration d'O₂ d'environ 19,4 %. Afin d'évaluer les effets délétères de ce protocole d'anoxie-réoxygénation (A/R) sur l'intégrité fonctionnelle des cardiomyocytes, une étude préliminaire a été réalisée. Les résultats de cette étude ont démontré que ce protocole d'A/R est à l'origine de troubles fonctionnels caractérisés par une altération du raccourcissement cardiomyocytaire (Figure 28A), une élévation du Ca²⁺ basal (Figure 28B) et une réduction de l'amplitude du transitoire calcique (Figure 28C). La prévention des effets délétères de l'A/R par l'incubation dans le milieu de N-acetylcystéine (NAC, 20 μM), un antioxydant non spécifique, a permis de mettre en évidence le rôle majeur des RLO dans les atteintes cellulaires liées à d'A/R (Figure 28 DEF).

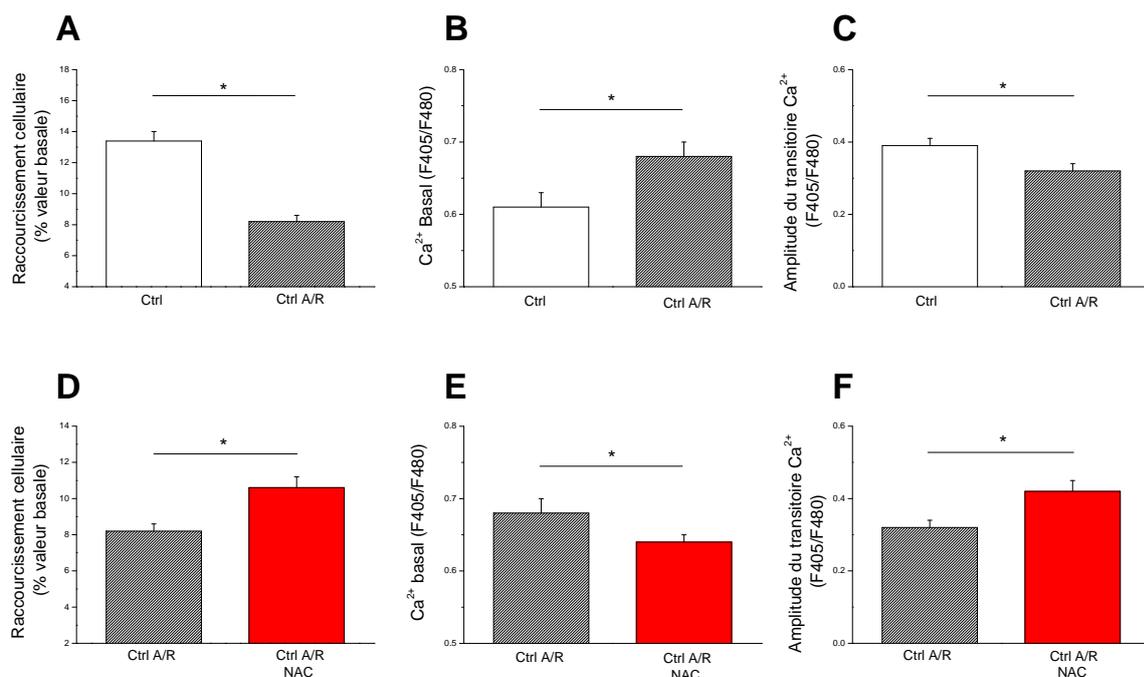


Figure 28 : Effets de l'anoxie-réoxygénation cellulaire sur A, le raccourcissement cellulaire ; B, le Ca²⁺ cytosolique diastolique ; C, L'amplitude du transitoire calcique ; et effets de l'incubation de N-Acetylcystéine (NAC, 20 μM) au cours de l'anoxie-réoxygénation cellulaire sur D, le raccourcissement cellulaire ; E, le Ca²⁺ cytosolique diastolique ; F, L'amplitude du transitoire calcique. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne ± SEM. * p<0,05

VI. Traitements pharmacologiques

Au cours des divers protocoles d'IR et d'A/R, différents traitements pharmacologiques ont été utilisés.

1. Le N-Acetylcystéine (NAC)

Le NAC est un antioxydant non spécifique utilisé à une concentration de 20 μM au cours des expérimentations sur cardiomyocytes isolés. Ainsi, afin d'évaluer l'implication de la formation de RLO, des lots de cardiomyocytes étaient incubés avec du NAC tout au long de la période d'anoxie et de réoxygénation.

2. Le S-methyl isothiouréa (SMT)

Le SMT est un inhibiteur spécifique de la iNOS quand il est utilisé à la concentration de 0,5 μM (Viridis et al., 2009). Afin d'évaluer l'implication de cette enzyme dans les atteintes morphologiques et fonctionnelles, son inhibition spécifique par le SMT a été réalisée au cours du protocole d'A/R cellulaire et d'IR myocardique. Lors de la phase cellulaire, les cellules étaient incubées avec du SMT tout au long de la période d'anoxie et de réoxygénation. Lors du protocole d'IR myocardique, le SMT était dilué dans la solution de Krebs-Henseleit, et permettait donc d'inhiber la iNOS tout au long de l'IR.