



HAL
open science

Étude du remodelage vasculaire cardiaque chez un modèle murin d'insuffisance cardiaque a fraction d'éjection préservée

Mathilde Doppler

► **To cite this version:**

Mathilde Doppler. Étude du remodelage vasculaire cardiaque chez un modèle murin d'insuffisance cardiaque a fraction d'éjection préservée. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04238730

HAL Id: dumas-04238730

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04238730v1>

Submitted on 12 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2023 THESE : 2023 – TOU 3 – 4054

ETUDE DU REMODELAGE VASCULAIRE CARDIAQUE CHEZ UN MODELE MURIN D'INSUFFISANCE CARDIAQUE A FRACTION D'EJECTION PRESERVEE

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

DOPPLER Mathilde, Marie, Margot

Directrice de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

JURY

PRESIDENTE :

Mme Laurence LAMANT

Professeure à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURES :

Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

Mme Armelle DIQUELOU

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITEE :

Mme Kathleen Mc ENTEE

Professeure à l'Université Libre de Bruxelles

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **FUSADE-BOYER**, *Microbiologie et infectiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

Remerciements

A Madame la professeure Laurence LAMANT,

Professeure à l'institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole
Anatomie et cytologie pathologiques

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Mes hommages les plus respectueux.

A Madame la professeure Isabelle RAYMOND-LETRON,

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Histologie - Anatomie Pathologique

Pour avoir accepté de m'accompagner et m'avoir fourni un soutien sans faille tout le long de la rédaction de ce manuscrit.

Remerciements affectueux.

A Madame la professeure Armelle DIQUELOU,

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Médecine interne - Cardiologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter le rôle d'assesseur de cette thèse.

Sincères remerciements.

A Madame la professeure Kathleen MC ENTEE,

Professeure à l'Université Libre de Bruxelles
Spécialiste européen en cardiologie
Médecine interne - Cardiologie

Pour m'avoir proposé ce sujet passionnant, pour son accompagnement sans faille et son accueil chaleureux tout au long du déroulement de ce projet. Merci.

Hommages respectueux et sincères remerciements.

Liste des abréviations

Ac = Anticorps

Ang-1 : Angiopoïétine 1

Ang-2 : Angiopoïétine 2

CMH : Cardiomyopathie hypertrophique

DAB : 3,3'-diaminobenzidine

DC : Débit cardiaque

FC : Fréquence cardiaque

FE : Fraction d'éjection

Flt-1 : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1* (aussi appelé VEGFR-1)

Flk-1 : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (aussi appelé VEGFR-2 ou KDR)

FPG : *Fasting Plasma Glucose*

FS : Fraction de raccourcissement

HFpEF = *Heart Failure with preserved Ejection Fraction* = ICfEp

HPRT-1 = hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase 1

HIF-1 : *Hypoxia Inductible Factor-1*

HRE : *Hypoxia Responsive Element*

IC : Insuffisance cardiaque

ICfEp : Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée = HFpEF

IgG : Immunoglobuline G

IHC : Immunohistochimie

KDR : *Kinase insert Domain Receptor/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (aussi appelé VEGFR-2 ou Flk-1)

LVIDd : Diamètre interne du ventricule gauche en diastole (*Left Ventricular Internal Diameter in diastol*)

LVRWT : Epaisseur relative de la paroi du ventricule gauche (*Left Ventricle Relative Wall Thickness*)

OP : *Obesity Prone*

OR : *Obesity Resistant*

P : Pression

PBS : *Phosphate-Buffered Saline*

PC : Péricytes

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PTD : Pression minimale ou télédiastolique,

PECAM-1 : *Platelet/endothelial cell adhesion molecule -1*

PED : Pression de fin de diastole

PTS : Pression maximale ou systolique

RT-PCR : *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*

Tie-2 : *Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains*, récepteur de Ang-1 et Ang-2

V : Volume

VEGF : *Vascular Endothelium Growth Factor*

VEGFR-1 : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1* (aussi appelé Flt-1)

VEGFR-2 : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (aussi appelé Flk-1 ou KDR)

VES : Volume d'éjection systolique

VG : Ventricule gauche

VSMC : Cellules musculaires lisses vasculaires

VTS : Volume minimal ou volume télésystolique,

VTD : Volume maximal ou volume télédiastolique

ΔV : Variation de volume

ΔP : Variation de pression

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	2
INTRODUCTION	6
1. Le système cardiovasculaire	7
1.1. Rappels anatomiques	7
1.1.1. Le cœur	7
1.1.2. Les vaisseaux sanguins	8
1.1.3. La vascularisation du cœur	9
1.2. Rappels histologiques	10
1.2.1. Organisation générale du tissu cardiaque	10
1.2.2. Les cardiomyocytes	11
1.2.3. Les vaisseaux	12
1.2.4. Les capillaires	13
1.3. Rappels physiologiques	14
1.3.1. L'activité électrique du cœur	14
1.3.2. Le cycle cardiaque	17
1.3.3. La boucle Pression/Volume ventriculaire gauche	18
1.3.4. Innervation du cœur	20
2. L'insuffisance cardiaque	21
2.1. Modifications des performances cardiaques	21
2.1.1. Diminution de l'inotropisme	22
2.1.2. Diminution du lusitropisme	23
2.1.3. Diminution de la compliance	23
2.1.4. Augmentation de la post-charge	25
2.1.5. Augmentation de la précharge	26
2.2. Remodelage cardiaque	27
2.2.1. Hypertrophie du myocarde et des cardiomyocytes	27
2.2.2. Atrophie des cardiomyocytes	28
2.2.3. Mort cellulaire	29
2.2.4. Fibrose	29
2.2.5. Vasculogénèse et angiogénèse	30
3. Le syndrome métabolique et l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	34
3.1. Le syndrome métabolique	34
3.2. L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	34
3.3. Modèle murin d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	36

3.3.1.	Confirmation du syndrome métabolique dans le modèle étudié	37
3.3.2.	Développement d'une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	40
Objectif du travail.....		45
Matériel et méthode		45
1.	Immunohistochimie	46
1.1.	Principe.....	46
1.1.1.	Immunohistochimie indirecte	46
1.1.2.	Méthode d'amplification ABC (Avidin-Biotin Complexe)	46
1.2.	Protocole	47
1.3.	Quantification.....	50
2.	RT-qPCR.....	51
2.1.	Principe.....	51
2.2.	Protocole	55
2.2.1.	Extraction d'ARN	55
2.2.2.	Choix et validation des amorces.....	56
2.2.3.	RT-qPCR	57
3.	Analyses statistiques	58
Résultats.....		59
1.	Quantification des capillaires dans le myocarde.....	59
1.1.	Reproductibilité de la méthode.....	59
1.2.	Densité capillaire	59
2.	Expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse	61
2.1.	Validation des amorces	61
2.2.	Expression de VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-1 et VEGFR-2.....	62
2.3.	Expression de Ang1, Ang2 et Tie-2	63
2.4.	Expression de HIF-1	64
Discussion.....		65
Conclusion		68
Bibliographie.....		69
Annexe 1 : Comptage en double aveugle des cardiomyocytes et capillaires		75
Annexe 2 : Protocole de fixation et d'inclusion des organes		76
Annexe 3 : Protocole validation des amorces sur série de dilution		77

INTRODUCTION

Dans le cadre de ma thèse vétérinaire, j'ai eu la chance de réaliser mon stage sous la supervision de la Professeure Kathleen Mc Entee au sein du Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie (LAPP) à l'Université Libre de Bruxelles (ULB) situé sur le campus Erasme.

Le LAPP est un laboratoire de recherche et d'enseignement composé de plusieurs académiques exerçant des fonctions de chercheurs et professeurs, d'étudiants en thèse, de technologues de laboratoire et d'une secrétaire. Le LAPP élabore et réalise des projets de recherche fondamentale et translationnelle dans le domaine de la physiopathologie du système cardiovasculaire et de l'hypertension pulmonaire

Le bâtiment où se situe le laboratoire est composé de bureaux, de salles dédiées à l'enseignement et de salles dédiées à la recherche. Il est organisé en plateaux où sont rassemblées les personnes d'une même structure de recherche comme par exemple le Laboratoire de Reproduction humaine ou encore le Département de Biochimie.

Le sujet de ma thèse vétérinaire, dans la continuité de la thèse de doctorat de Géraldine Hubesch¹, sera de caractériser le remodelage myocardique dans un modèle d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée chez des rats génétiquement prédisposés à l'obésité et nourris avec une alimentation hypercalorique. Lors de ce stage, je me suis principalement intéressée à la capillarité du myocarde.

1. Le système cardiovasculaire

1.1. Rappels anatomiques

1.1.1. Le cœur

Le cœur est un organe musculaire creux localisé dans l'espace médiastinal. Il est divisé en deux parties (cœur gauche et cœur droit) séparées par une paroi et ne communiquant par entre elles.

Le cœur droit (ou partie droite du cœur) est constitué de 2 cavités, l'oreillette et le ventricule droits, séparés par la valve tricuspide formée de 3 feuillets. Le cœur gauche comprend l'oreillette et le ventricule gauches séparés par la valve mitrale formée de 2 feuillets.

Le cœur a la forme d'une pyramide inversée, dont la pointe, appelée apex, formée par le ventricule gauche (VG), se dirige vers le bas, vers l'arrière et vers la gauche reposant sur le diaphragme tandis que la base est constituée des 2 oreillettes.

Le cœur gauche représente 2/3 de la masse cardiaque, il éjecte le sang oxygéné dans l'aorte tandis que le cœur droit éjecte le sang non-oxygéné dans l'artère pulmonaire (Figure 1).

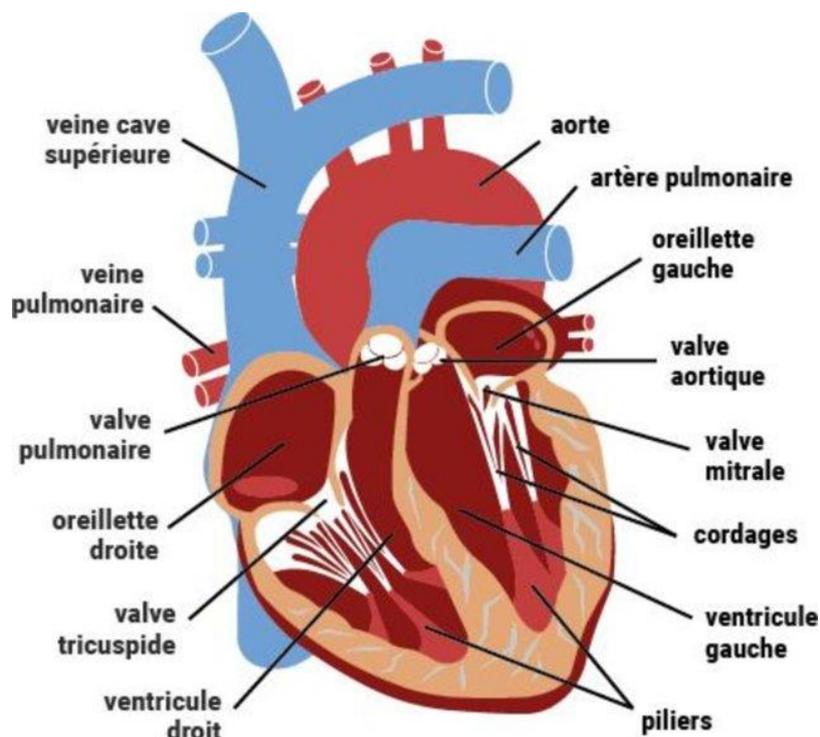


Figure 1 : Anatomie du cœur ²

1.1.2. Les vaisseaux sanguins

Le système vasculaire est formé de 2 circuits en série, la petite circulation ou circulation pulmonaire et la grande circulation ou circulation systémique. La première part du cœur droit par l'artère pulmonaire et possède un seul réseau capillaire, elle permet la réoxygénation du sang vicié (bleu) au niveau du poumon. La deuxième démarre à la sortie du ventricule gauche par l'aorte et possède de nombreux réseaux capillaires en parallèle, elle permet l'approvisionnement en oxygène des organes.

Il existe 5 catégories de vaisseaux sanguins : les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines (Figure 2) :

- Les artères sont les vaisseaux transportant le sang qui part du cœur.
- Les artérioles microscopiques (taille inférieure à 100µm) sont la continuation des petites artères musculaires, en amont des capillaires.
- Les capillaires sont les plus petits vaisseaux qui vont être le lieu d'échange entre le sang et les cellules. Les capillaires sont organisés en anastomoses permettant une suppléance en cas d'occlusion d'une branche.
- Les veinules regroupent toutes les veines de petits calibre, récoltant le sang des capillaires.
- Les veines vont ramener le sang vers le cœur. On distingue deux types de veines suivant leur topographie : (1) les veines propulsives infracardiaques, équipées de valvules anti-reflux, assurent le retour du sang vers le cœur contre la pesanteur ; (2) les veines réceptrices supracardiaques plus « passives », la circulation étant assumée essentiellement par la pesanteur.

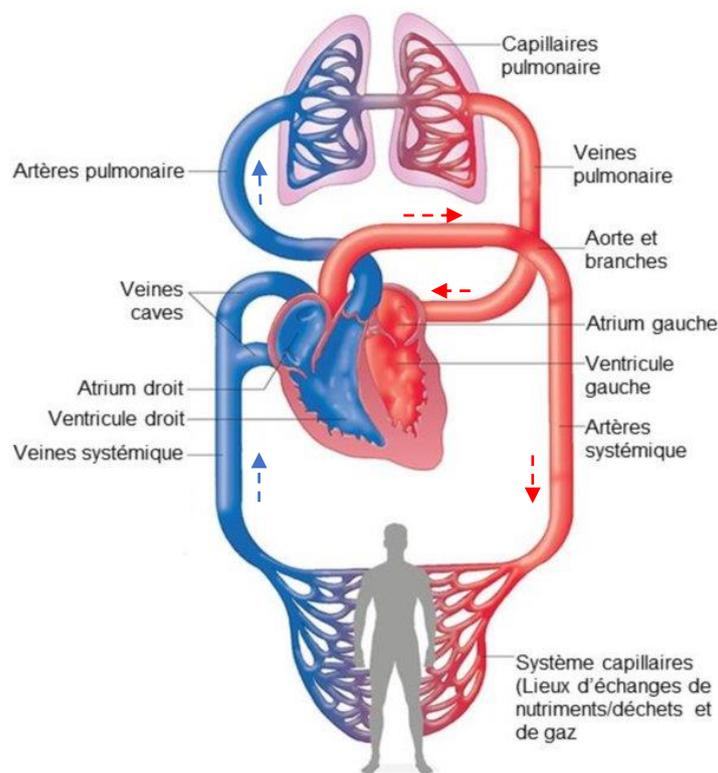


Figure 2 : Circulation sanguine pulmonaire et systémique²

1.1.3. La vascularisation du cœur

L'irrigation sanguine du cœur est assurée par le réseau d'artères coronaires présentes en surface du cœur.

Deux artères coronaires principales se détachent à la base de l'aorte au niveau du sinus de Valsalva (Figure 3) :

- L'artère coronaire droite chemine le long du sillon auriculo-ventriculaire et se divise à la partie inférieure du cœur en artère interventriculaire postérieure et en artère rétro ventriculaire. Elle irrigue le ventricule droit et la partie inférieure du ventricule gauche.
- L'artère coronaire gauche chemine entre le tronc pulmonaire et l'atrium gauche et se divise très tôt en artère interventriculaire antérieure et en artère circonflexe. Ces artères irriguent la partie supérieure du ventricule gauche et le septum interventriculaire.

Il existe 3 veines coronaires principales :

- La grande veine coronaire naît à la base du cœur, longe l'artère interventriculaire antérieure par la gauche et s'engage dans le sillon coronaire pour devenir satellite de l'artère circonflexe.
- La petite veine coronaire s'engage dans le sillon auriculo ventriculaire droit
- La veine coronaire moyenne s'engage dans le sillon interventriculaire

Ces 3 veines aboutissent au niveau du sinus coronaire qui s'ouvre dans l'oreillette droite. Il existe cependant d'autres petites veines qui ne vont pas se drainer dans le sinus coronaire, mais vont aboutir directement dans le ventricule gauche, participant ainsi à un shunt physiologique du poumon.

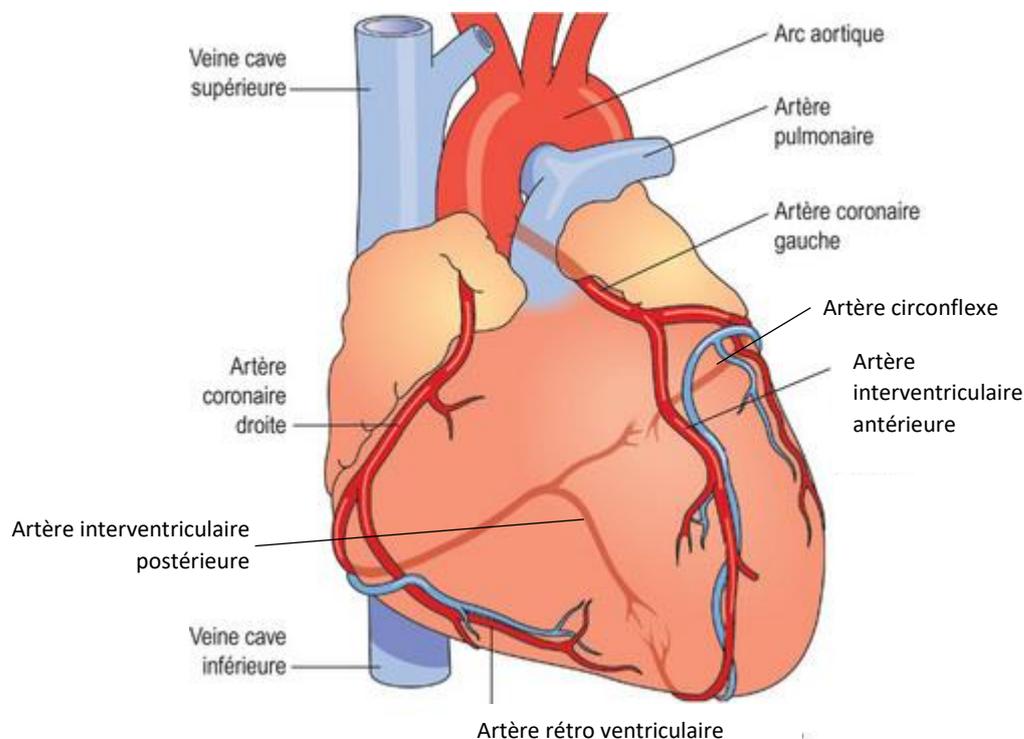


Figure 3 : Vascularisation du cœur ³

Les artères coronaires superficielles se ramifient puis génèrent des artères perforantes s'enfonçant dans le myocarde de la région sous-péricardique vers la région sous-endocardique en donnant des petites artères myocardiques, des artérioles et des capillaires où les échanges ont lieu ⁴(Figure 4).

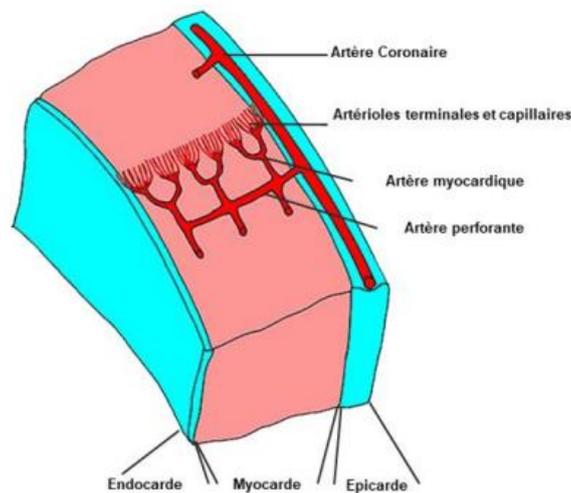


Figure 4 : Vascularisation du myocarde²

1.2. Rappels histologiques

1.2.1. Organisation générale du tissu cardiaque

Les parois cardiaques comportent de 3 couches : l'endocarde, le myocarde et le péricarde (Figure 5) :

- L'endocarde est la couche la plus interne, en contact avec le sang. Il est constitué d'une seule couche de cellules endothéliales et d'une lame basale
- Le myocarde est la couche moyenne, la plus épaisse, constituée de cardiomyocytes, cellules contractiles qui forment la pompe cardiaque et de cardiomyocytes spécialisés dans l'impulsion électrique et la conduction de l'influx.
- Le péricarde est le tissu conjonctif entourant le cœur. Il est composé de deux structures : le péricarde séreux (formé de l'épicarde, adhérent au myocarde et d'un feuillet pariétal) et le péricarde fibreux fixant le cœur à la cavité thoracique. Entre les deux feuillets du péricarde séreux se situe un espace virtuel contenant une petite quantité de liquide, facilitant ainsi le glissement des deux feuillets et les mouvements cardiaques dans la cavité péricardique.

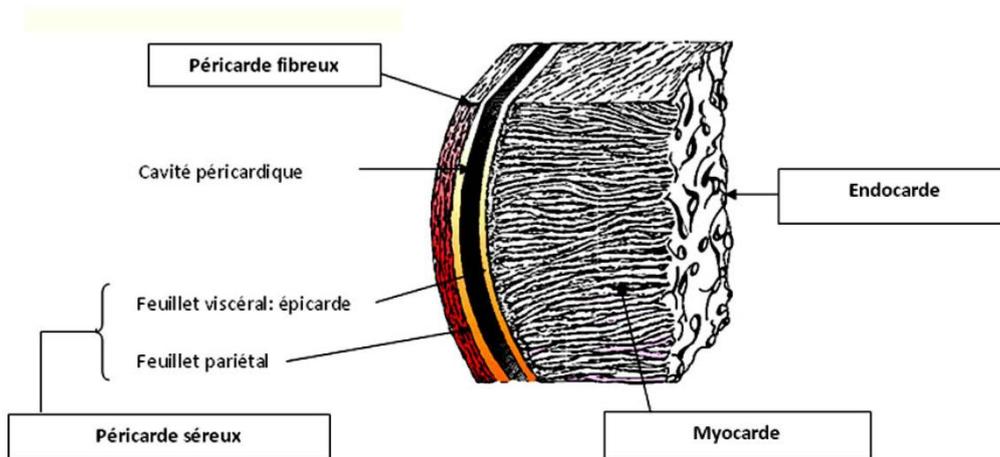


Figure 5 : Organisation du tissu myocardique ⁵

1.2.2. Les cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont des cellules contractiles striées, mono- ou binucléées, mesurant entre 100 et 150µm de long et environ 20µm de diamètre. Ils sont reliés les uns aux autres par des disques intercalaires (Figure 6) contenant des desmosomes, permettant l'adhérence des cellules, et des jonctions GAP formées de connexons capables de propager un signal électrique.

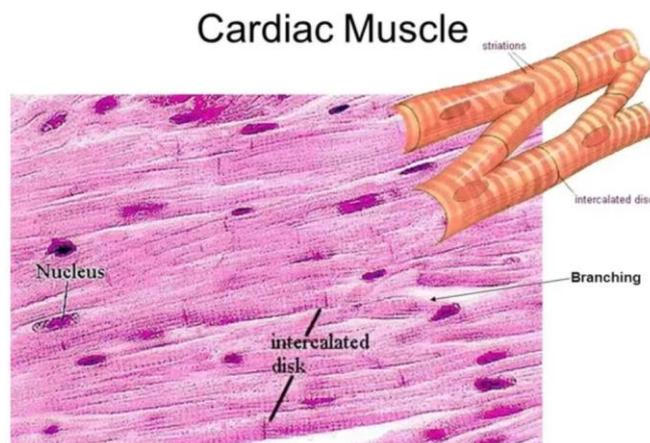


Figure 6 : Histologie des cardiomyocytes ⁶

Le sarcomère, unité fonctionnelle du cardiomyocyte, est un réseau organisé de myofibrilles formées de 2 types de myofilaments : les filaments épais contenant la myosine et les fins contenant l'actine. Il est responsable de l'apparence striée du cardiomyocyte.

Le sarcomère est situé entre deux stries Z. Les filaments fins sont à cheval sur 2 stries Z et les filaments épais sont au centre du sarcomère créant une alternance de bandes claires (bandes I) et de bandes sombres (bandes A). La région de la bande A où les filaments de myosine ne croisent pas les filaments d'actine est la bande H (Figure 7).

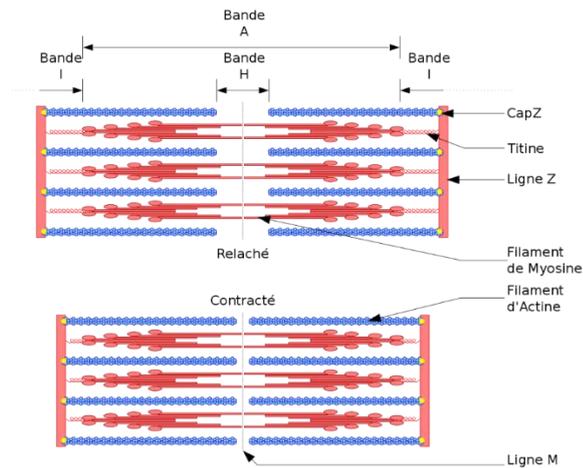


Figure 7 : Organisation d'un sarcomère⁷

1.2.3. Les vaisseaux

La paroi d'un vaisseau sanguin est composée de 3 tuniques superposées (Figure 8) :

- Une tunique interne, l'intima constituée d'un endothélium simple reposant sur une lame basale composée d'un tissu conjonctif lâche ;
- Une tunique moyenne, la média plus ou moins riche en fibres élastiques (artères élastiques) et en fibres musculaires lisses (artères musculaires) ;
- Une tunique externe, l'adventice, constituée principalement de tissu conjonctif.

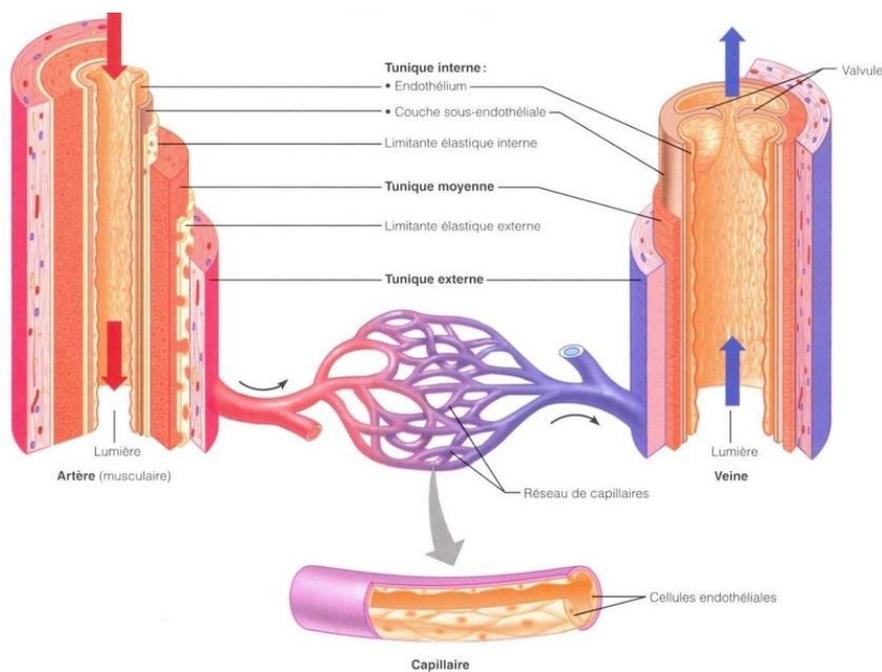


Figure 8 : Histologie des vaisseaux sanguins⁸

Les différences histologiques en fonction du type de vaisseau sont :

- Les artères ont une lumière ronde et une paroi épaisse. La média y est bien développée.
- La média des grandes artères conductrices est riche en fibres élastiques, son élasticité sert à amortir la pression du sang exercée sur les parois.
- La média des artères distributrices est riche en fibres musculaires lisses, par leur état de vasoconstriction/vasodilatation, les artères distributrices adaptent le débit de perfusion aux besoins des organes.
- Les artérioles sont également riches en fibres musculaires lisses. Leur diamètre est inférieur à 100µm, c'est l'endroit de plus haute résistance.
- Les capillaires, constitués d'une seule couche de cellules endothéliales, sont spécialisés dans les échanges entre le sang et les cellules. Leur diamètre moyen est de 5µm, laissant circuler les hématies les unes après les autres.
- Les veinules et les veines ont une grande lumière et une paroi fine par rapport aux artérioles et aux artères. Leur média est pauvre en cellules musculaires lisses, l'adventice riche en fibres élastiques, est la tunique la plus développée. Les veinules et veines propulsives sont équipées de valvules qui sont des replis de l'intima empêchant les reflux de la colonne sanguine soumise à la pesanteur.

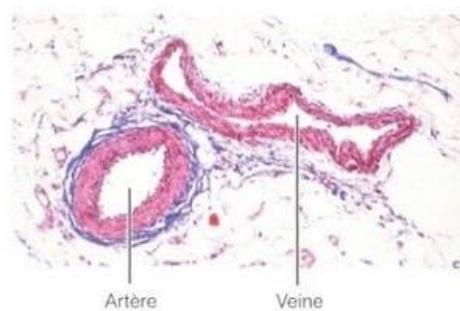


Figure 9 : Artère et veine⁸

Le cœur étant un organe vital grand consommateur d' O₂ (50-100 µL O₂/min/g⁴), sa perfusion est essentiellement sous contrôle intrinsèque : le tonus vasculaire (vasodilatation et vasoconstriction) est principalement contrôlé par des facteurs locaux afin de maintenir en permanence un équilibre entre les besoins et les apports en O₂ du tissu myocardique. La perfusion du cœur est prioritaire par rapport à la majorité des autres organes. Le tonus vasculaire dépend également de l'interaction des catécholamines sur deux types de récepteurs : les récepteurs alpha 1 induisent une vasoconstriction et les récepteurs bêta-2 induisent une vasodilatation⁹. Dans la média des artères et artérioles coronaires, les récepteurs alpha-1 sont en minorité comparé aux récepteurs bêta-2 ce qui signifie qu'une activation du système nerveux sympathique n'entraînera pas de vasoconstriction, la perfusion coronaire sera protégée.

1.2.4. Les capillaires

Il existe différents types de capillaires (Figure 10)

- Les capillaires continus ont une lame basale complète et des cellules endothéliales jointives. Ils sont présents dans les muscles et notamment le myocarde, le tissu conjonctif et les poumons
- Les capillaires fenêtrés ont une lame basale continue et des cellules endothéliales jointives mais qui présentent des nanopores (~70nm) ce qui permet un passage rapide des liquides. Généralement présents dans les tissus où les échanges entre volume plasmatique et volume interstitiel sont importants comme dans les reins, l'intestin grêle et les glandes endocrines.
- Les capillaires discontinus ou sinusoides ont une lame basale perforée et des cellules endothéliales non jointives avec des pores parfois de grande taille entre les cellules. Spécialisés dans les échanges de macromolécules et de cellules, ils sont notamment présents dans les tissus hépatiques, hématopoïétiques et spléniques.

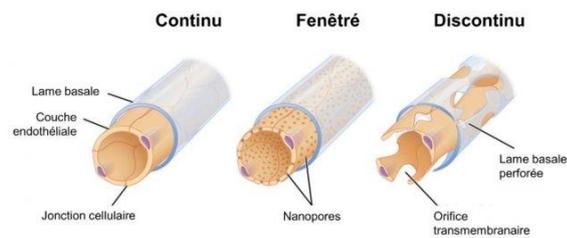


Figure 10 : Différents types de capillaires sanguins²

1.3. Rappels physiologiques

1.3.1. L'activité électrique du cœur

Le cœur est une pompe pulsatile qui fonctionne par cycles de contraction-relaxation du myocarde et des cardiomyocytes. L'activité mécanique (contraction-relaxation) est induite par l'activité électrique (potentiel d'action)

L'activité électrique du cœur dépend des structures suivantes : le nœud sinusal, les jonctions GAP, la voie internodale, le nœud auriculoventriculaire, le faisceau de His et les fibres de Purkinje (Figure 11).

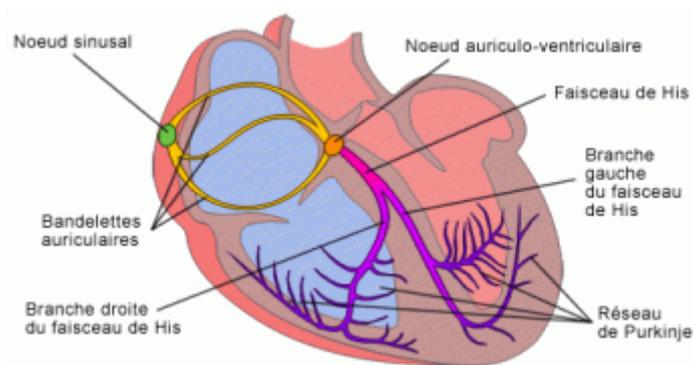


Figure 11 : Anatomie des fibres spécialisées dans la propagation du signal électrique du cœur¹⁰

Le nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite, est constitué de cardiomyocytes particuliers appelés cellules pacemakers. Dotées de canaux « funny », canaux à cations non sélectifs qui s'activent lorsque la cellule est à son potentiel de repos, les cellules pacemakers ont un potentiel de repos (phase 4 du potentiel d'action) instable, en pente, elles atteignent leur seuil de dépolarisation spontanément. (Figure 12)

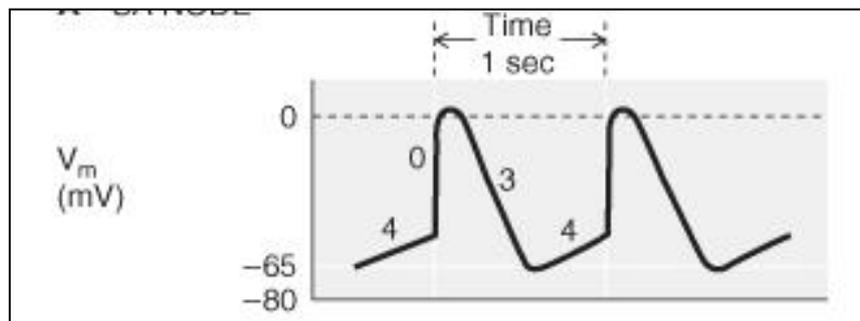


Figure 12 : Potentiel d'action d'une cellule pacemaker¹¹. V_m = Potentiel membranaire¹²

La dépolarisation se propage de proche en proche dans les oreillettes, grâce aux jonctions GAP, le tissu atrial formant un syncytium. La dépolarisation des oreillettes est représentée sur l'ECG par l'onde P. Elle permet l'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique et l'initiation de leur contraction. (Figure 13)

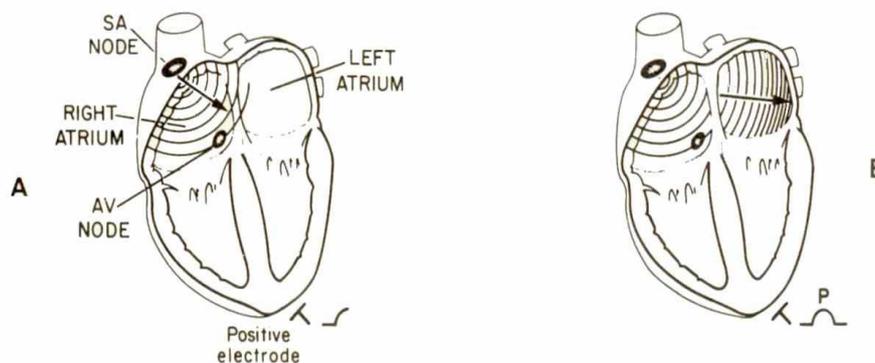


Figure 13 : La dépolarisation des oreillettes génère l'onde P¹²

Le signal électrique, ou potentiel d'action, atteint le nœud auriculo-ventriculaire par la voie de conduction internodale. La conduction de l'influx y est ralentie laissant le temps aux oreillettes de se contracter avant d'initier la dépolarisation et la contraction des ventricules (intervalle P-Q).

Le faisceau de His, voie de conduction ultra rapide, conduit le signal électrique dans le muscle ventriculaire. Le potentiel d'action suit les branches droite et gauche du faisceau de His, avant de rejoindre le réseau des fibres Purkinje puis se propager de cellule en cellule par les jonctions GAP. La base du septum interventriculaire se dépolarise donnant l'onde Q (Figure 14.A), puis la masse ventriculaire gauche et droite (onde R) (Figure 14.B), finalement la dépolarisation remonte vers la base (onde S). (Figure 14.C)

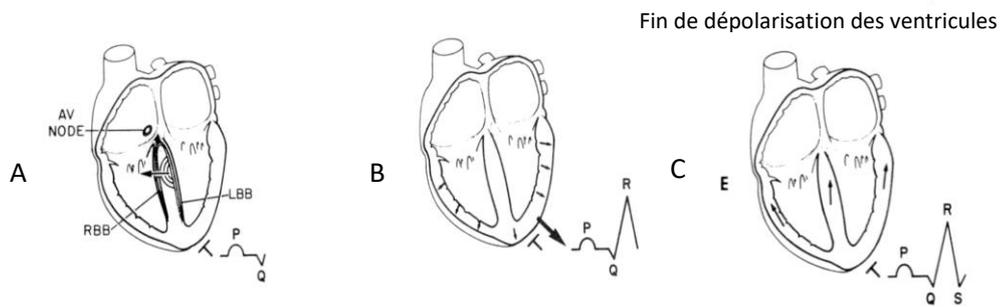


Figure 14 : La dépolarisation des ventricules génère le complexe QRS¹²

Après la dépolarisation et la contraction, les cardiomyocytes ventriculaires se repolarisent (onde T) (Figure 15). La repolarisation des cardiomyocytes atriaux est cachée par la dépolarisation simultanée des cardiomyocytes ventriculaires.

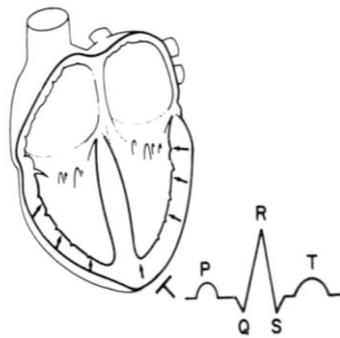


Figure 15 : La repolarisation des ventricules génère l'onde T¹²

Le potentiel d'action d'un cardiomyocyte ventriculaire possède les caractéristiques suivantes : potentiel de repos stable (Figure 16 phase 4), dépolarisation rapide suite à l'ouverture des canaux sodium voltage dépendants (phase 1), plateau (phases 2 et 3) de par la présence de canaux calcium voltage dépendants, puis phase de repolarisation (phase 4) suite à l'ouverture des canaux potassium voltage dépendants. Pendant les phases 2 et 3 (et une partie de la phase 4), les cardiomyocytes sont en période réfractaire, ils ne répondent à aucun autre stimulus. La longue période réfractaire des cardiomyocytes empêche la possibilité de contraction tétanique du muscle qui mettrait fin à l'action de pompage du cœur.¹³

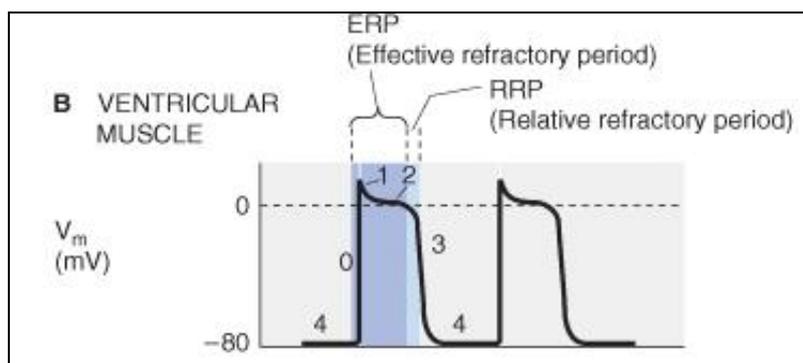


Figure 16 : Potentiel d'action d'un cardiomyocyte ventriculaire. V_m = potentiel membranaire¹²

1.3.2. Le cycle cardiaque

Chaque cycle comprend la phase de contraction ventriculaire ou systole et la phase de relaxation ventriculaire ou diastole. La circulation du sang dépend des différences de pression hydrostatique : le sang circule de l'endroit où la pression est la plus élevée vers l'endroit où la pression est la plus basse. Le cycle cardiaque se déroule en plusieurs étapes, simultanément dans le cœur gauche et droit :

Remplissage ventriculaire passif : La pression atriale devient supérieure à la pression ventriculaire et les valves auriculoventriculaires s'ouvrent, le ventricule se remplit (Figure 17 phase 1 early)

Diastasis : Les pressions ont tendance à s'égaliser et le remplissage des ventricules est ralenti, cette phase dépend de la durée de la diastole. (Figure 17 phase 1 early)

Remplissage ventriculaire actif : Les oreillettes se sont dépolarisées et se contractent, augmentant la pression atriale pour permettre le remplissage actif. (Figure 17 phase 1 late)

Contraction isovolumique : Les ventricules se sont dépolarisés et se contractent. Immédiatement le gradient de pression hydrostatique s'inverse et les valves auriculoventriculaires se ferment créant le 1^{er} bruit audible au stéthoscope. La pression ventriculaire augmente rapidement, toutes les valves sont fermées (d'où le terme isovolumique) (Figure 17 Phase 2)

Ejection ventriculaire rapide : La pression ventriculaire dépasse la pression artérielle, les valves artérielles s'ouvrent et le sang est éjecté dans la circulation. (Figure 17 Phase 3)

Protodiastole : Dès que les ventricules se repolarisent et initient leur relaxation, la pression ventriculaire devient inférieure à la pression artérielle et les valves artérielles se ferment créant le 2^{ème} bruit audible au stéthoscope.

Relaxation isovolumique : Toutes les valves sont fermées (d'où le terme isovolumique), les parois ventriculaires se relâchent, la pression ventriculaire chute tandis que les oreillettes poursuivent leur remplissage jusqu'à ce que la pression atriale devienne supérieure à la pression ventriculaire, un nouveau cycle démarre (Figure 17 phase 4 puis 1 early).

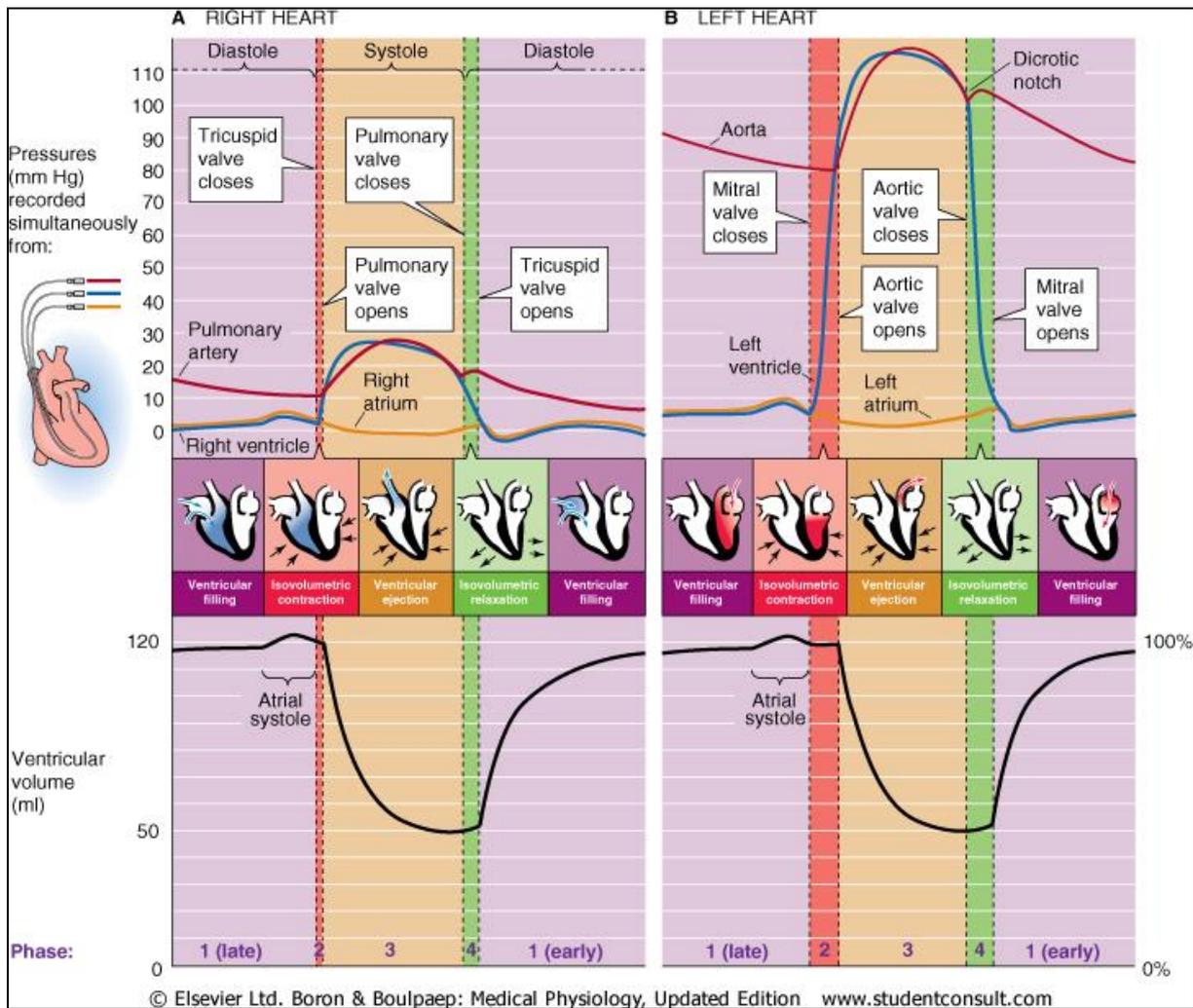


Figure 17 : Cycle cardiaque et variations de pression au sein des différentes cavités du coeur¹¹

1.3.3. La boucle Pression/Volume ventriculaire gauche

La boucle Pression/Volume (boucle P/V) est une représentation graphique permettant de visualiser et d'évaluer la performance du cœur en plaçant en ordonnée l'évolution de la pression et en abscisse l'évolution du volume au cours d'un même cycle cardiaque (Figure 18).

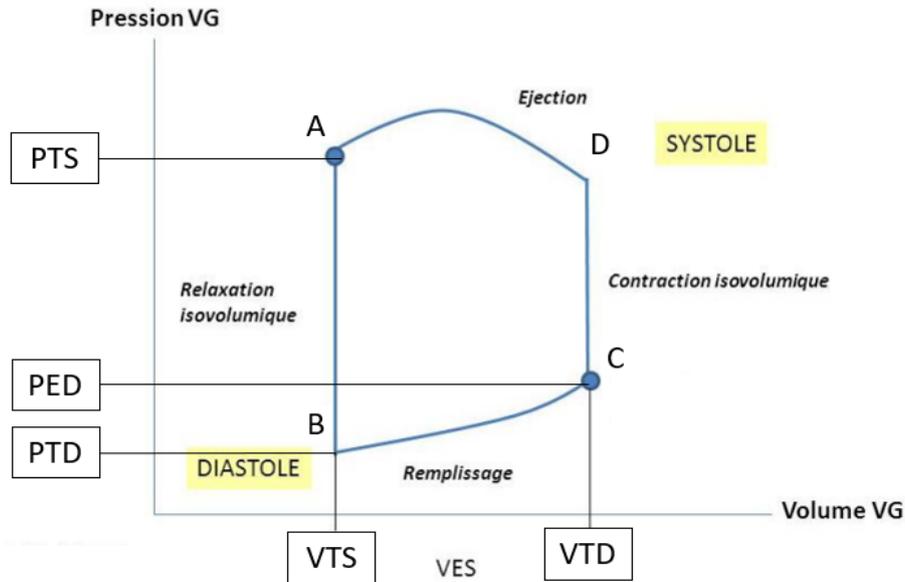


Figure 18 : Courbe Pression/Volume du ventricule gauche. AB = relaxation isovolumique, B = ouverture de la valve mitrale, BC = remplissage ventriculaire (remplissage passif, diastasis et remplissage actif), C = fermeture de la valve mitrale, CD = contraction isovolumique, D = ouverture de la valve aortique, DA = éjection ventriculaire, A = fermeture de la valve aortique, PTS = pression maximale ou télésystolique, PTD = pression minimale ou télédiastolique, PED = pression de fin de diastole, VTS = volume minimal ou télésystolique, VTD = volume maximal ou télédiastolique, (adapté de¹⁴)

A partir de la boucle P/V, de la mesure du volume maximal ou télédiastolique (VTD) et minimal ou télésystolique (VTS), nous pouvons calculer le volume d'éjection systolique (VES)¹³

$$\text{VES (ml)} = \text{VTD} - \text{VTS}$$

Nous pouvons également calculer la fraction d'éjection (FE) qui représente la proportion du volume de fin de diastole qui est éjecté pendant la systole

$$\text{FE (\%)} = ((\text{VTD} - \text{VTS}) / \text{VTD}) \times 100 \text{ ou } (\text{VES}/\text{VTD}) \times 100$$

En modifiant rapidement les conditions de charge, la boucle P/V se déplace. La pente de la droite reliant les points de fin de systole s'appelle élastance télésystolique ou élastance maximale, elle reflète la contractilité du myocarde, plus elle est élevée, plus la contractilité sera élevée. (Figure 19)

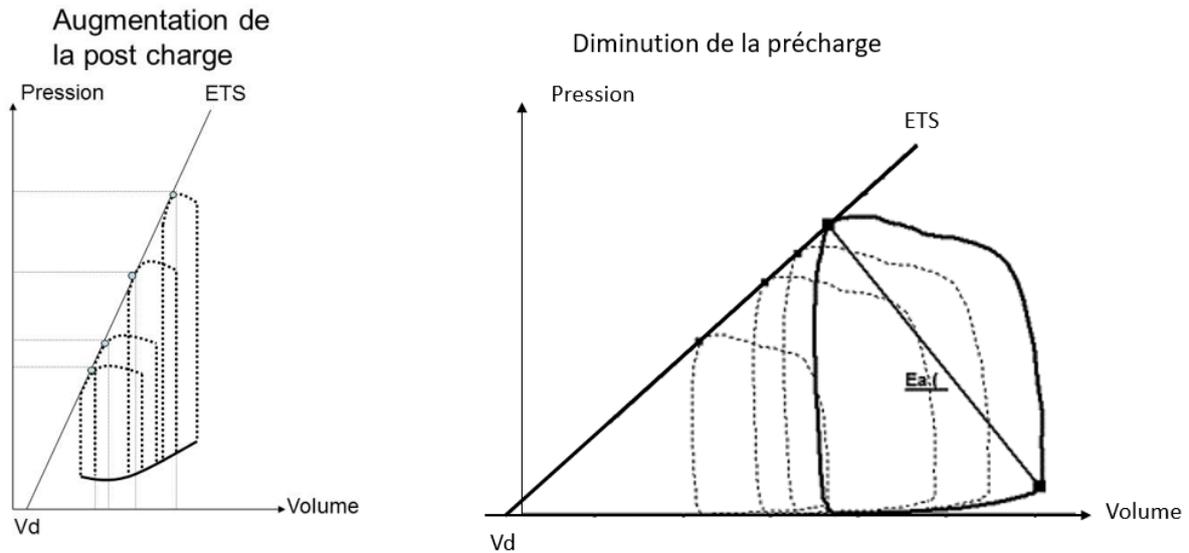


Figure 19 : Droite d'élastance télésystolique obtenue lors d'une variation brutale de la postcharge (A) ou de la précharge (B) (ETS = droite d'élastance télésystolique ; Vd = point par lequel la droite ETS coupe l'axe des abscisses) adapté de¹⁴

1.3.4. Innervation du cœur

L'activité du cœur est modulée par le système nerveux autonome formé de deux composants antagonistes : le système parasympathique (nerfs vagues droit et gauche) et le système sympathique (nerfs cardiaques droit et gauche).

Les centres bulbaires sympathique et parasympathique (ou centre vasomoteur) reçoivent les afférences (notamment des barorécepteurs aortiques et carotidiens) et envoient des efférences (stimulatrices ou inhibitrices) au centre médullaire du système nerveux sympathique et au centre crânien du système nerveux parasympathique (noyau du nerf vague). Les nerfs cardiaques innervent oreillettes et ventricules, les nerfs vagues innervent les oreillettes (Figure 20). Le système nerveux sympathique a une fonction « d'accélérateur » en augmentant le rythme et la force du battement cardiaque. Le système nerveux parasympathique quant à lui a un rôle de « frein » et agit en ralentissant le rythme cardiaque.

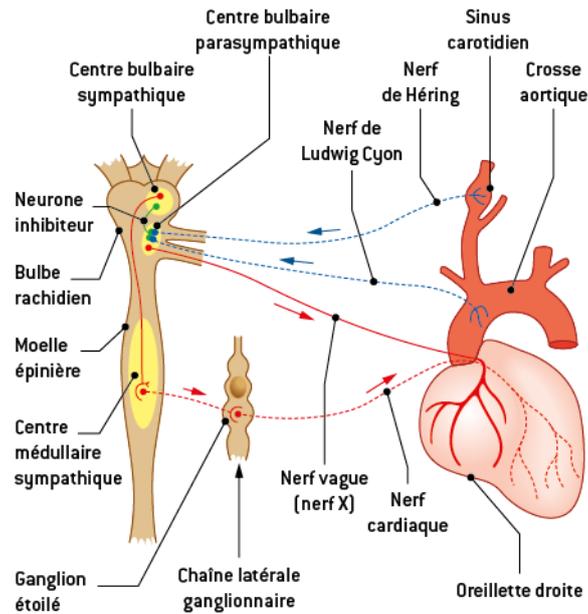


Figure 20 : Innervation du cœur par le système nerveux autonome, voies afférentes (bleu) et efférentes (rouge)¹²

2. L'insuffisance cardiaque

2.1. Modifications des performances cardiaques

Les performances cardiaques sont définies par le débit cardiaque (DC) lui-même fonction de la fréquence cardiaque (FC) et du VES.

La FC dépend directement du bathmotropisme (l'excitabilité des cellules cardiaques) et du dromotropisme (la conduction de la dépolarisation). Le VES dépend de l'inotropisme (la contractilité du myocarde ou force de contraction intrinsèque du myocarde, indépendamment des conditions de charge), du lusitropisme (la relaxation du myocarde) et de la compliance du myocarde. Le VES dépend également de 2 facteurs extrinsèques, la précharge (volume de remplissage télédiastolique du ventricule ou degré d'étirement des cardiomyocytes avant leur contraction) et la postcharge (force contre laquelle le cœur doit se battre lors de l'éjection dans la circulation ou force de résistance que rencontrent les fibres myocardiques lors de leur contraction) (Figure 21).

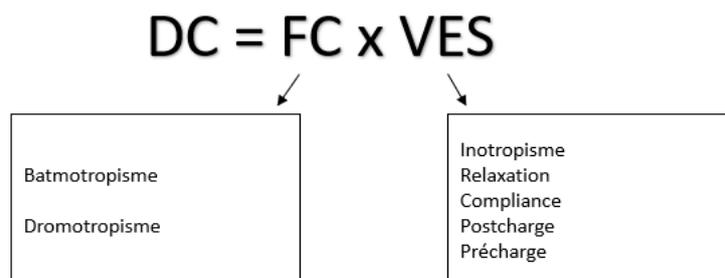


Figure 21 : Définition du débit cardiaque et facteurs influant celui-ci (DC = Débit cardiaque ; FC = Fréquence cardiaque ; VES = Volume d'éjection systolique)^{Source personnelle}

La variation d'un de ces facteurs de performance cardiaque va avoir un effet direct sur le DC. D'autres facteurs peuvent alors se modifier pour ramener le DC à la normale.

Certaines variations sont physiologiques. Par exemple, lors d'un effort physique, l'activation du système nerveux sympathique va augmenter le bathmotropisme et le dromotropisme entraînant une augmentation de la FC et va augmenter l'inotropisme et le lusitropisme entraînant une augmentation du VES avec comme conséquence une augmentation du DC malgré l'augmentation de la pression artérielle et donc de la postcharge.

Nous allons nous intéresser aux variations pathologiques qui mènent à l'insuffisance cardiaque, c'est-à-dire à une diminution des performances cardiaques et des apports sanguins aux organes.

2.1.1. Diminution de l'inotropisme

Sur le schéma ci-dessous, le rectangle noir représente l'évolution de la pression (P) et du volume (V) du ventricule gauche en situation normale (de base), la droite passant par le point de fin de systole est l'élastance télésystolique (ETS1), dont la pente représente l'inotropisme. Le rectangle rouge montre l'évolution de la boucle P/V lors d'une diminution de l'inotropisme représentée par la droite (ETS2) dont la pente est diminuée. Nous observons une diminution du VES (VES2 < VES1) et de la FE (Figure 22).

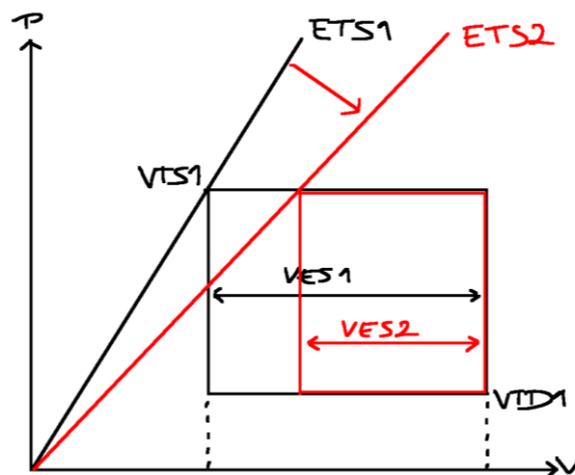


Figure 22 : Modification de la boucle P/V du ventricule gauche lors d'une diminution de l'inotropisme. P = Pression, V= Volume, VES = Volume d'éjection systolique, ETS = Elastance télésystolique, VTS = Volume télésystolique, VTD = Volume télédiastolique^{Source personnelle}

Afin de répondre aux besoins de l'organisme et rétablir le DC, le cœur peut accélérer et/ou augmenter le VES en accroissant le volume télédiastolique, rectangle bleu (Figure 23). Il va ainsi se dilater, c'est ce

qui est observé lors de cardiomyopathie dilatée, insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite, pathologie acquise bien connue chez les chiens de grande race.

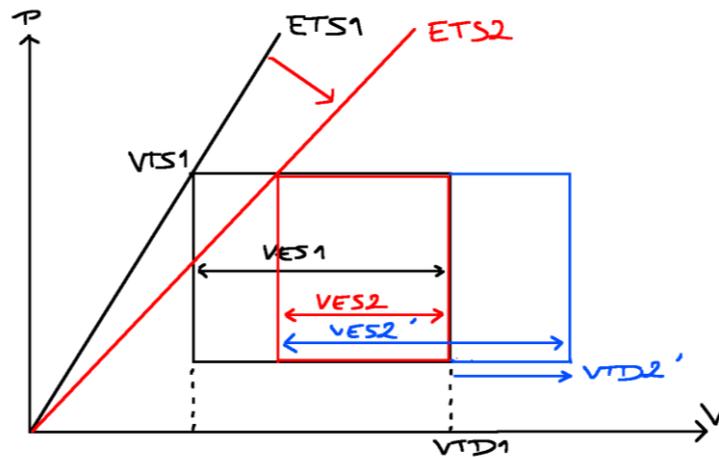


Figure 23 : Rétablissement du volume d'éjection systolique (VES) par augmentation du volume télédiastolique (VTD) lors d'une diminution de l'inotropisme. P = pression, V = volume, VTS = volume télé-systolique. ^{Source} personnelle

2.1.2. Diminution du lusitropisme

Lors d'une diminution de la relaxation du ventricule, celui-ci va se relâcher plus lentement. On conserve donc une boucle P/V normale, cependant le segment (AB) correspondant à la phase de relaxation isovolémique va prendre plus de temps. Une anomalie de relaxation peut être mise en évidence par une diminution de dp/dt_{min} , valeur la plus négative de la dérivée première de la pression en fonction du temps. Une anomalie de la relaxation ne mène pas seule à une insuffisance cardiaque.

2.1.3. Diminution de la compliance

La compliance est la capacité structurale du ventricule à pouvoir se distendre et se remplir sans augmenter la pression cavitaire ($\Delta V/\Delta P$). Lorsque celle-ci est diminuée, le remplissage du ventricule s'accompagne d'une augmentation de pression et la capacité de remplissage diminue. Sur la boucle P/V, on peut voir un VTD2 inférieur au VTD1 « normal » (Figure 24). Le VES est diminué.

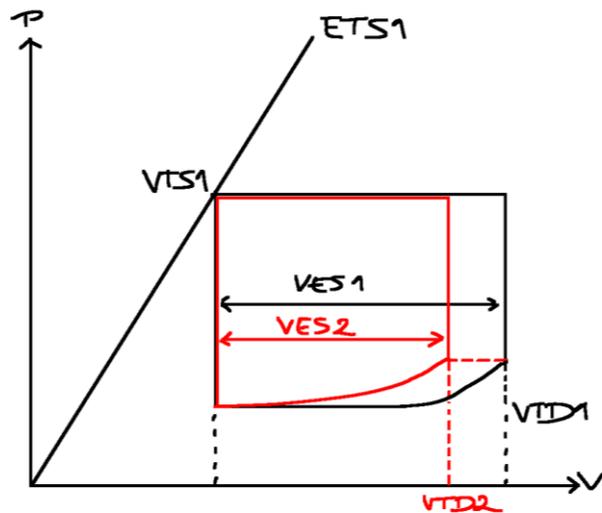


Figure 24 : Modification de la boucle pression/volume lors d'une diminution de la compliance. P = pression, V = volume, VTD = volume télédiastolique, VES = volume d'éjection systolique Source personnelle

Afin de répondre aux besoins de l'organisme et rétablir le DC, le coeur peut accélérer et/ou augmenter le VES en diminuant le VTS, Il va augmenter sa contractilité (Figure 25).

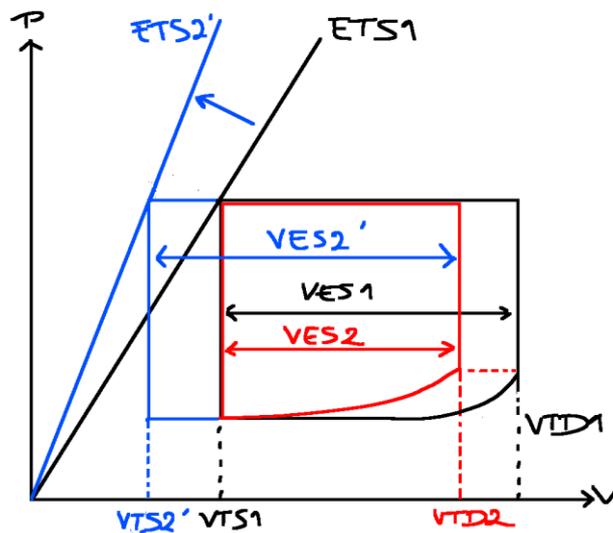


Figure 25 : Rétablissement du VES par augmentation de la contractilité. P = pression, V = volume, VTD = volume télédiastolique, VTS = volume télésystolique, VES = volume d'éjection systolique Source personnelle

L'augmentation du stress de paroi va induire progressivement une hypertrophie du myocarde, qui peut aggraver la diminution de la compliance, entraîner un cercle vicieux et mener à l'insuffisance cardiaque. Notons que la FE est maintenue. En médecine vétérinaire, on observe ce processus lors de cardiomyopathie hypertrophique et restrictive, pathologies acquises fréquentes chez le chat.

2.1.4. Augmentation de la post-charge

La postcharge dépend de la résistance principalement artériolaire, de la pulsatilité, des ondes réfléchies, de la compliance des grandes artères et de la viscosité du sang. Lors d'une augmentation de postcharge, la pression dans l'aorte augmente. Cela implique que pour que les valves aortiques s'ouvrent, le ventricule va devoir atteindre une pression plus importante. Pour une même contractilité, La phase d'éjection sera réduite et le VES diminué (Figure 26).

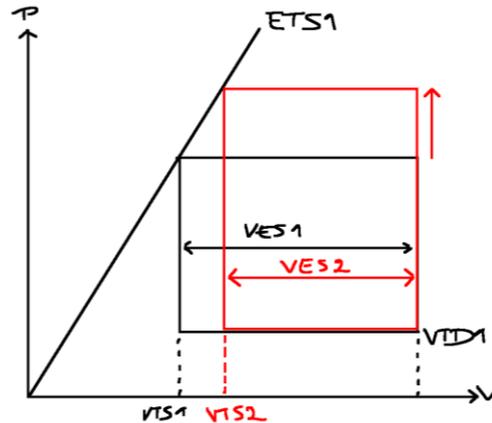


Figure 26 : Modification de la boucle Pression/Volume lors d'une augmentation de la post-charge. P = pression, V = volume, VTS = volume télé-systolique, VTD = volume télé-diastolique VES = volume d'éjection systolique Source personnelle

Afin de répondre aux besoins de l'organisme et rétablir le débit cardiaque, le coeur peut accélérer et/ou augmenter le VES en diminuant le VTS, Il va augmenter sa contractilité (Figure 27)

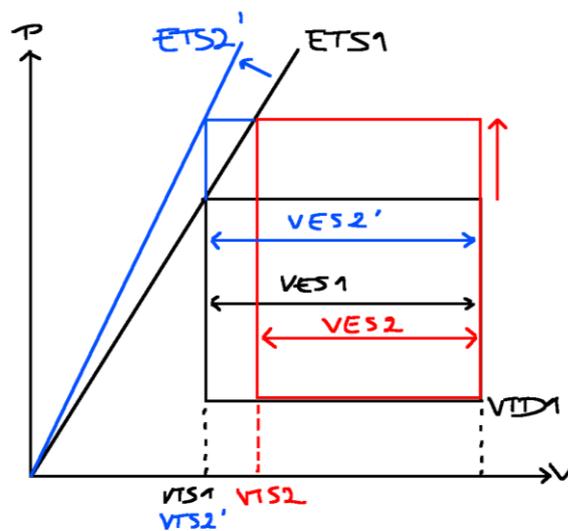


Figure 27 : Rétablissement du VES par augmentation de la contractilité. P = pression, V = volume, VTS = volume télé-systolique, VTD = volume télé-diastolique VES = volume d'éjection systolique Source personnelle

L'augmentation du stress de paroi va induire une hypertrophie concentrique du myocarde, qui peut réduire le VTD et la compliance myocardique, entraînant un cercle vicieux et mener à l'insuffisance cardiaque. Notons également que la FE est maintenue. On retrouve ce processus chez les individus atteints d'hypertension artérielle systémique, ou de sténose aortique.

2.1.5. Augmentation de la précharge

La relation de Franck-Sarling montre que dans un cœur sain, toute augmentation de la précharge augmente la longueur télédiastolique des sarcomères optimalise le positionnement des filaments de myosine et d'actine, favorise les ponts actine-myosine et accroît le VES. Suivant ce principe, lorsque le ventricule se remplit plus, il se contracte mieux et éjecte plus. (Figure 28)

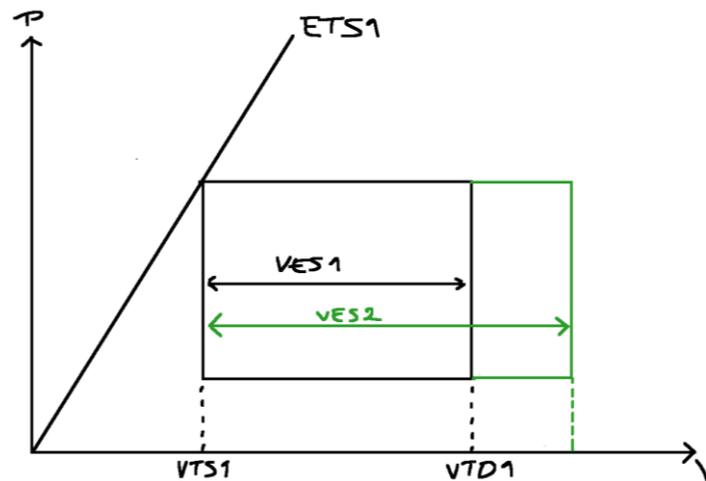


Figure 28 : Modification de la boucle P/V du VG lorsque la précharge est augmentée, et que la compliance du VG n'est pas dépassée. P = pression, V = volume, VTS = volume télésystolique, VTD = volume télédiastolique
VES = volume d'éjection systolique Source personnelle

Lorsque la compliance du ventricule est dépassée, la PTD va augmenter, l'augmentation de pression sera transmise passivement dans l'oreillette gauche puis dans les veines pulmonaires et dans les capillaires pulmonaires ce qui va amener à une insuffisance cardiaque dite congestive (congestion veineuse). (Figure 29)

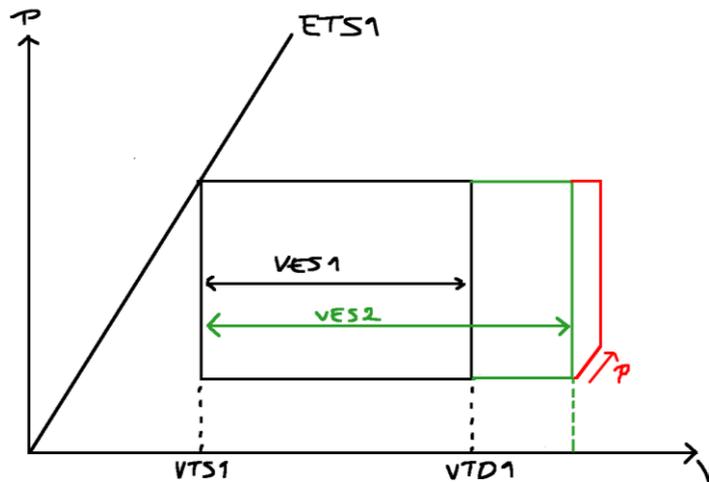


Figure 29 : Modification de la boucle Pression/Volume du VG lors d'augmentation de la précharge une fois la compliance du VG dépassée. P = pression, V = volume, VTS = volume télésystolique, VTD = volume télédiastolique VES = volume d'éjection systolique Source personnelle

L'augmentation de la précharge peut avoir plusieurs origines, par exemple lors d'insuffisance mitrale une partie du VES n'est pas éjecté dans l'aorte mais retourne dans l'oreillette, augmentant ainsi le volume en amont. Notons qu'un cœur souffrant d'une baisse d'inotropisme augmente moins son VES lors d'augmentation de la précharge et peut même diminuer son VES lorsque le VTD est exagéré.

2.2. Remodelage cardiaque

Le remodelage cardiaque peut être décrit à l'échelle macroscopique ou microscopique. Il s'agit des modifications structurelles en réponse à un dommage ou à une surcharge.

Macroscopiquement, le remodelage se traduit par une modification de la forme et/ou de la taille du cœur secondaire à une altération de l'épaisseur des parois et du volume des cavités. A l'échelle cellulaire, le remodelage se traduit par une modification des cardiomyocytes (hypertrophie, atrophie, œdème cellulaire, mort cellulaire) de l'interstitium (œdème, inflammation, fibrose) et de la vascularisation intramyocardique (angiogenèse, fibrose périvasculaire).

2.2.1. Hypertrophie du myocarde et des cardiomyocytes

L'hypertrophie du myocarde se développe souvent en réponse à une surcharge hémodynamique. Cette surcharge hémodynamique est représentée par le stress de paroi (σ) qui est proportionnel à la pression du VG (P) et à son rayon (r), et inversement proportionnel à son épaisseur (h) (Figure 30). Les cardiomyocytes vont s'hypertrophier pour diminuer le stress de paroi.

$$\sigma \propto \frac{P \times r}{h}$$

Figure 30 : Calcul du *stress de paroi* (σ) selon la pression (P), le rayon (r), et l'épaisseur (h) du ventricule gauche¹⁵

Il existe deux types d'hypertrophie :

- L'hypertrophie concentrique : secondaire à une surcharge barométrique (sténose ou hypertension) à un défaut génétique (cardiomyopathie hypertrophique) ou à une stimulation hormonale (hyperthyroïdie), l'hypertrophie des cardiomyocytes par multiplication des sarcomères en parallèle entraîne une augmentation de la masse et de l'épaisseur des parois (h) et souvent une diminution du diamètre cavitaire (r). L'épaisseur relative des parois est augmentée.
- L'hypertrophie excentrique : secondaire à une surcharge volumique (régurgitation, shunt), l'hypertrophie des cardiomyocytes par multiplication des sarcomères en série entraîne une augmentation de la masse mais la dilatation cavitaire fait que l'épaisseur relative des parois n'est pas augmentée. Dans le cas de la cardiomyopathie dilatée, l'hypertrophie est faible, insuffisante par rapport à la dilatation cavitaire et les parois vont alors s'affiner.

2.2.2. Atrophie des cardiomyocytes

Chez certaines races (Dogue Allemand, Terre Neuve), la cardiomyopathie dilatée est caractérisée par une désorganisation myofibrillaire et une atrophie des cardiomyocytes, ceux-ci prennent l'aspect de fibres amincies et ondulantes (Figure 31).



Figure 31 : Coupe histologique du ventricule gauche d'un chien présentant une cardiomyopathie dilatée. Echelle : 20µm. Coloration : trichrome de Mason¹⁶

2.2.3. Mort cellulaire

La mort cellulaire des cardiomyocytes est principalement induite par apoptose ou nécrose. Il existe d'autres mécanismes cellulaires tels que l'autophagie ou la pyroptose qui ne seront pas abordés ici.

L'apoptose :

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme physiologique, homéostasique intervenant dans le développement, la différenciation et le renouvellement cellulaire.

Au cours de l'apoptose, de nombreux facteurs tels que des protéases (par ex des caspases) et des DNases activées par les caspases mènent à la destruction de diverses protéines intracellulaires et la fragmentation de l'ADN. Des corps apoptotiques sont formés, et des signaux permettent ensuite la phagocytose de ceux-ci¹⁷. Le processus apoptotique ne provoque pas de réaction inflammatoire¹⁸.

Dans le cœur sain, le taux d'apoptose est excessivement faible (0,001 à 0,01%)¹⁹. Les études montrent que le taux d'apoptose augmente dans des situations pathologiques telles que la cardiomyopathie dilatée, la décompensation cardiaque, l'infarctus du myocarde ou l'ischémie-reperfusion^{19,20}.

La nécrose :

La nécrose est un mécanisme de mort cellulaire non-programmé, concernant un groupe de cellule. C'est un phénomène pathologique entraînant une réaction inflammatoire. La nécrose est induite par la présence de lésions cellulaires ne pouvant pas être réparées et traduit donc toujours un état pathologique. Elle peut survenir lors de différentes situations : infection bactérienne, ischémie, etc.

Le processus de nécrose débute par une altération de la structure ou de la fonction de la membrane plasmique qui va engendrer une entrée d'eau dans la cellule. Les cellules gonflent, les organites vont éclater et libérer des enzymes de lyse. La nécrose va déclencher une réaction inflammatoire locale et des cellules phagocytaires vont nettoyer la zone nécrosée.

La nécrose est le mécanisme majoritaire de mort cellulaire lors d'ischémie mais participe également à la perte de cardiomyocytes dans l'insuffisance cardiaque d'origine non ischémique²⁰

2.2.4. Fibrose

La fibrose est une lésion non-spécifique d'un organe, caractérisée par le développement de la matrice extra-cellulaire associée à la multiplication des fibroblastes. Ceux-ci vont synthétiser les composants de la matrice extra-cellulaire tels que le collagène, la fibronectine ou la laminine. Il existe un équilibre entre production et destruction de celle-ci qui est régulé par des facteurs antifibrotiques comme les métalloprotéinases matricielles et profibrotiques comme les inhibiteurs des métalloprotéinases. Un

déséquilibre en faveur de la production aboutit à la fibrose qui va alors être source d'insuffisance fonctionnelle²¹.

Il existe deux types de fibroses :

- La fibrose réactive, présente le plus souvent suite à une réaction inflammatoire, qui va se retrouver autour des vaisseaux (fibrose périvasculaire) et/ou entre les cardiomyocytes (fibrose interstitielle). La fibrose interstitielle est retrouvée dans les cardiomyopathie hypertrophiques et restrictives chez le chat, elle rigidifie le tissu myocardique²²⁻²⁴. La fibrose périvasculaire et l'artériosclérose (ou fibrose de la paroi vasculaire) sont retrouvées dans l'endocardiose mitrale chez le chien et associé à l'augmentation de la concentration sérique en troponine^{25 26}.
- La fibrose réparatrice, formation d'un tissu cicatriciel qui va combler l'espace laissé par une perte de cardiomyocytes. Elle est primordiale après un infarctus du myocarde, complication bien décrite des cardiomyopathies chez le chat^{22,27}.

2.2.5. Vasculogenèse et angiogenèse

Le développement du système vasculaire se fait suivant deux phénomènes successifs : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

- La vasculogenèse est la différenciation de cellules précurseurs endothéliales, ou angioblastes, en cellules endothéliales et la formation d'un nouveau réseau vasculaire primitif.
- L'angiogenèse est le remodelage d'un réseau vasculaire primaire (issu de la vasculogenèse ou du réseau vasculaire préexistant) en un réseau plus complexe. Ce processus est stimulé essentiellement par un facteur de croissance : le *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF).

Durant l'embryogenèse, les précurseurs endothéliaux s'assemblent en un réseau vasculaire primitif, c'est la vasculogenèse. Ensuite, ce réseau croît et s'organise. Des cellules murales, comprenant les péricytes et les cellules musculaires lisses vasculaires sont recrutées afin de stabiliser les vaisseaux en croissance, donnant naissance au réseau vasculaire mature, c'est l'angiogenèse. Les vaisseaux lymphatiques, quant à eux, se développent par transdifférenciation des veines (Figure 32).

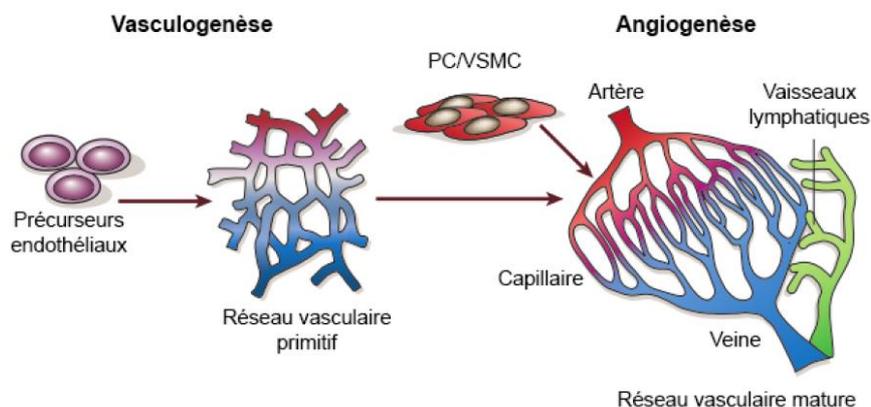


Figure 32 : Développement du réseau vasculaire²⁸

Le réseau vasculaire d'un adulte est dans un état dit quiescent, avec seulement 0,01% des cellules endothéliales en division²⁹. Néanmoins, les cellules endothéliales restent hautement sensibles aux nombreux facteurs pro-angiogéniques. Ainsi, l'angiogenèse peut être réactivée ponctuellement dans diverses situations physiologiques et pathologiques (croissance ou régénération d'un organe, menstruations, croissance tumorale, ...).

L'angiogenèse peut se produire par trois procédés, aboutissant tous à une expansion du système vasculaire : par bourgeonnement (*sprouting*), par intussusception, ou par septation (*Bridging*) (Figure 33). Le mécanisme par bourgeonnement est le plus courant et le mieux étudié nous nous intéresseront donc à celui-ci par la suite.

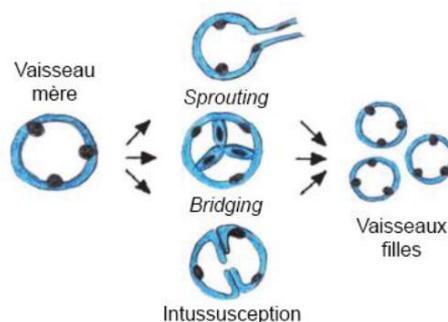


Figure 33 : Mécanismes de l'angiogenèse²⁸

Stimulus de l'angiogenèse :

Lorsqu'un tissu augmente de taille, l'apport en oxygène est limité par le nombre de vaisseaux l'irrigant et ce nombre devient insuffisant. Le tissu va alors présenter des zones en hypoxie. Cela va induire la stabilisation du facteur de transcription *Hypoxia Inductible Factor-1* (HIF-1) qui va ensuite s'associer à des *Hypoxia Responsive Element* (HRE) présents au niveau du promoteur des gènes impliqués dans l'angiogenèse. La réponse est une augmentation de l'expression de facteurs proangiogéniques et de leurs récepteurs tels que le VEGF et ses récepteurs (VEGFR-1 et VEGFR-2) ou encore l'angiopoïétine-2 (Ang2) (Figure 34)

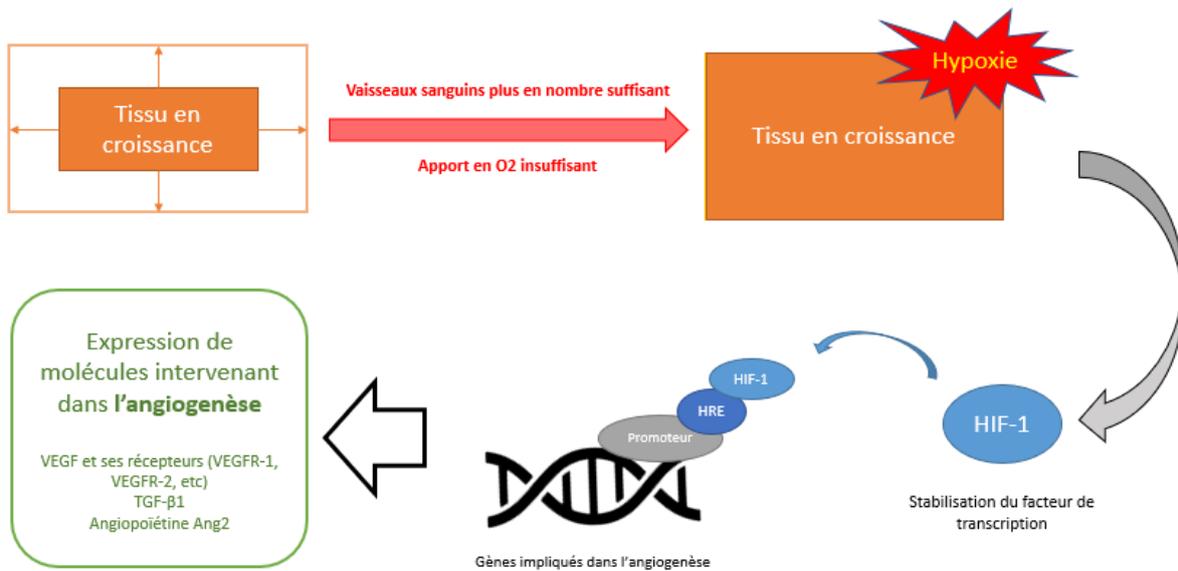


Figure 34 : Chaîne de signalisation de l'hypoxie et activation de l'angiogénèse

Les différentes étapes de l'angiogénèse (figure 35)

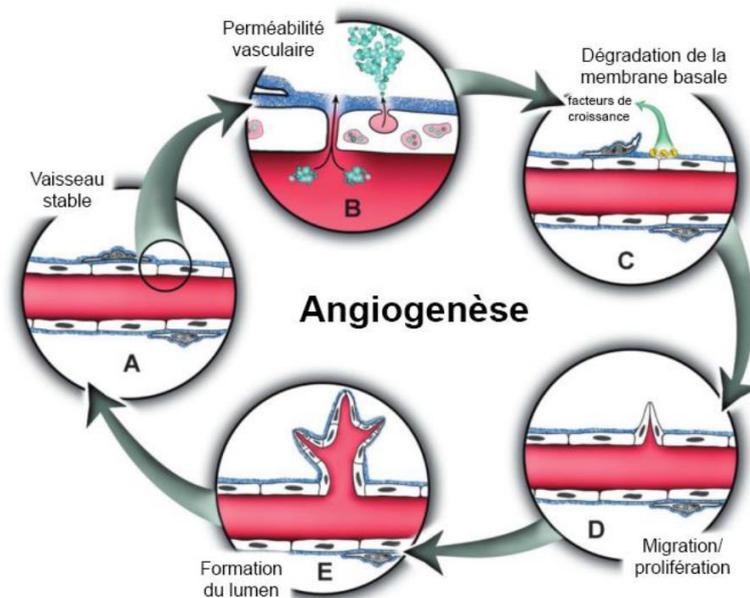


Figure 35 : Les étapes de l'angiogénèse²⁸

a) Vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire

La vasodilatation, en réponse à l'oxyde nitrique (NO), est l'une des premières étapes de l'angiogénèse. Le VEGF, en induisant l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), stimule la production de NO par les cellules endothéliales. Ceci conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire. La perméabilité vasculaire est également favorisée par l'Ang2, un inhibiteur de la voie de

signalisation Tie2, permettant le détachement des cellules murales et la détérioration de la matrice environnante. (Figure 35)

b) Migration et prolifération

La dégradation de la membrane basale rend l'environnement propice à la migration des cellules endothéliales, tout en continuant de libérer des facteurs de croissance. S'en suit la migration et la prolifération des cellules endothéliales

L'induction du bourgeonnement lors de l'angiogenèse repose essentiellement l'interaction du VEGF avec un de ses récepteurs : le VEGFR-1 (ou Flt-1). L'Ang2 y participe en inhibant la stabilisation des cellules endothéliales par son rôle antagoniste du récepteur Tie-2.

Le vaisseau en élongation est alors composé de cellules endothéliales spécialisées (cellules *Tip* et cellules *Stalk*). La cellule *Tip* se trouve à l'extrémité du vaisseau en élongation, et est suivie par les cellules *Stalk*. La cellule *Tip* exprime les récepteurs VEGFR-2 (ou KDR) qui permettent à celle-ci d'être sensible aux gradients de VEGF. Les cellules *Tip* vont donc être capables de suivre les zones de fortes concentrations en VEGF qui sont les zones d'hypoxie³⁰. Le passage du phénotype *Tip* en *Stalk* se fait dans un sens comme dans l'autre grâce à la voie Notch. Au cours de l'élongation, chaque cellule peut passer facilement d'un phénotype à un autre suivant le besoin (Figure 36).

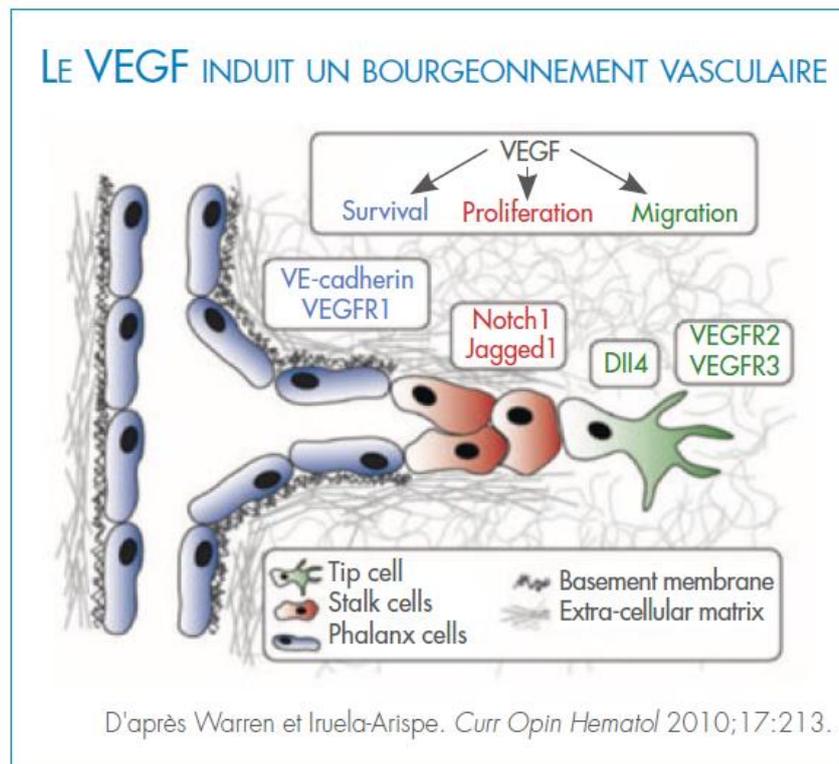


Figure 36 : Rôle du VEGF et de ses récepteurs dans le bourgeonnement vasculaire au cours de l'angiogenèse³¹

c) Stabilisation du vaisseau

L'angiopoïétine 1 (Ang1) intervient dans la stabilisation du nouveau capillaire ; lors de son interaction avec son récepteur Tie-2, il entraîne une cascade de phosphorylation permettant la stabilisation de la paroi du vaisseau.

3. Le syndrome métabolique et l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

3.1. Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est une association d'anomalies liées à l'obésité et plus précisément à l'accumulation excessive de graisse viscérale. Environ 30 à 35% de la population humaine européenne³² est concernée par ce syndrome. Il se caractérise par³² :

- De l'obésité, évaluée par le tour de taille (>80cm chez les femmes et >94cm chez les hommes en Europe)
- Une hyperglycémie (glycémie à jeun > 5.6 mmol/L) et/ou une intolérance au glucose
- Une hypertriglycémie (Triglycérides > 1.7 mmol/L)
- Une augmentation de la pression artérielle systémique (Pression artérielle systolique >130 mmHg ou diastolique >85 mmHg)
- Un taux réduit de cholestérol HDL (*High Density Lipoprotein*) (<1.03 mmol/L chez les hommes, et <1.29 mmol/L chez les femmes)

Le syndrome métabolique est un facteur de risque majeur d'hypertension artérielle, d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral.

3.2. L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

L'IC correspond à une diminution des performances cardiaques, donc du débit cardiaque, entraînant une diminution de la perfusion des différents organes. Le cœur devient incapable d'assurer l'apport sanguin nécessaire aux besoins métaboliques et fonctionnels des organes des individus atteints. L'IC touche 2,3% de la population française (4% en Belgique) et jusqu'à 10% des personnes de plus de 70 ans³³ (20% des plus de 65ans en Belgique³⁴), représentant chez ces dernières la première cause d'hospitalisation.

La fraction d'éjection (FE) est la proportion du volume sanguin présent dans le ventricule gauche en fin de diastole qui est éjecté à chaque systole. Elle s'exprime en pourcentage. En Médecine humaine, on considère que la fraction d'éjection est réduite en dessous de 40%. Entre 40 et 49%, on la considère comme légèrement réduite, et au-delà de 50% on peut parler de fraction d'éjection préservée. La fraction d'éjection est généralement mesurée à l'échocardiographie.

On distingue donc deux types d'insuffisance cardiaque : l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (FE<40%) et l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEp) avec une FE>50%. Nous nous intéressons à cette dernière, qui représente plus de 50% des cas d'insuffisance cardiaque chez les personnes âgées (53% des patients hospitalisés entre 2002 et 2003 d'après une étude danoise³⁵).

Les signes cliniques d'ICFEp sont des signes typiques d'IC tels qu'une dyspnée, fatigabilité, œdèmes des membres inférieurs, etc³⁵. Plus de 80% des patients développent de l'hypertension pulmonaire³⁶.

Les patients atteints d'ICFEp sont le plus souvent âgés, de sexe féminin et atteints de plusieurs comorbidités telles que l'obésité, l'hypertension artérielle, le diabète, ...

Le diagnostic d'ICFEp est difficile à établir en raison du manque de critères spécifiques. Il est basé sur la présence de signes et symptômes d'IC associés à une fraction d'éjection du ventricule gauche normale ou modérément diminuée, l'absence de dilatation du ventricule gauche et la présence d'une anomalie structurelle pertinente telle qu'une hypertrophie du ventricule gauche³⁷.

D'après le European Heart Journal³⁸, qui complète les précédents critères de la Heart Failure Association (HFA), il n'existe pas de critères diagnostics non-invasifs, il est donc recommandé de baser le diagnostic sur une combinaison de mesures échocardiographies (structures et fonctions) et un dosage de peptides natriurétiques. Les critères majeurs non-invasifs (il en existe des mineurs moins spécifiques qui ne seront pas cités) du diagnostic d'ICFEp sont :

- FE > 50%
- Augmentation de l'épaisseur relative de la paroi du ventricule gauche (RWT), c'est-à-dire une augmentation de l'épaisseur de la paroi du ventricule (LVWT) sans dilatation associée (LVIDD = Diamètre du ventricule gauche en diastole). Un $RWT (= 2*LVWT/LVIDD) > 0,42$ traduit une hypertrophie concentrique qui est présente dans l'ICFEp.
- Mesure du flux Doppler transmitral (onde E) et d'un Doppler tissulaire (moyenne des ondes e' septale et latérale) : un rapport $E/e' > 15$ au repos permet d'évaluer une pression de remplissage élevée, corrélant avec une raideur du ventricule et de la fibrose, qui est un signe d'ICFEp.
- Vitesse de régurgitation tricuspидienne > 2,8m/s ou pression artérielle pulmonaire systolique > 35mmHg
- Volume de l'oreillette gauche > 34 mL/m²
- Dosage des NT-proBNP >220 pg/mL, ou des BNP >80 pg/mL

L'ensemble des critères permet d'attribuer un score ICFEp orientant le diagnostic (Figure 37). Un score supérieur ou égal à 5 permet de diagnostiquer une ICFEp.

	Functional	Morphological	Biomarker (SR)	Biomarker (AF)
Major	septal e' < 7 cm/s or lateral e' < 10 cm/s or Average E/e' ≥ 15 or TR velocity > 2.8 m/s (PASP > 35 mmHg)	LAVI > 34 ml/m ² or LVMI ≥ 149/122 g/m ² (m/w) and RWT > 0,42 #	NT-proBNP > 220 pg/ml or BNP > 80 pg/ml	NT-proBNP > 660 pg/ml or BNP > 240 pg/ml
Minor	Average E/e' 9 -14 or GLS < 16 %	LAVI 29-34 ml/m ² or LVMI > 115/95 g/m ² (m/w) or RWT > 0,42 or LV wall thickness ≥ 12 mm	NT-proBNP 125-220 pg/ml or BNP 35-80 pg/ml	NT-proBNP 365-660 pg/ml or BNP 105-240 pg/ml
	Major Criteria: 2 points	≥ 5 points: HFpEF		
	Minor Criteria: 1 point	2-4 points: Diastolic Stress Test or Invasive Haemodynamic Measurements		

Figure 37 : Scoring et critères diagnostiques de l'ICFep. SR = Sinusal Rythme ; AF = Atrial Fibrilation ; LAVI = Left Atrial Volume Index ; LVMI = Left Ventricul Mass Index ; RWT = Relative Wall Thikness ; GLS = Global Longitudinal Strain ; HFpEF = Heart Failure with Preserved Ejection Fraction³⁸

Jusqu'aujourd'hui, aucun traitement ne permet de réduire la morbi-mortalité chez les patients atteints d'ICFep. Une des raisons est qu'aucun modèle animal ne permet de reproduire le phénotype multifactoriel et multi organique de l'ICFep.

3.3. Modèle murin d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ce travail a développé un modèle murin d'ICFep.

Comme expliqué préalablement, la plupart des patients atteints d'ICFep présentent de multiples comorbidités. Les chercheurs ont émis l'hypothèse qu'un stress métabolique (alimentation hyperénergétique) chez les rats génétiquement prédisposés à l'obésité allait entrainer un syndrome métabolique puis une ICFep.

Des rats d'une lignée Sprague-Dawley prédisposée à l'obésité (Obese Prone ou OP) ont été comparés à des rats d'une lignée Sprague-Dawley résistante à l'obésité (Obese Resistant ou OR) provenant des laboratoires Charles River Laboratories Inc. (Wilmington, MA, USA).

Les rats OP étaient nourris ad libitum avec un régime riche en graisses (45% de lipides et 17% de glucides) et les rats OR avec un régime standard (5% de lipides et 2% de glucides). Deux protocoles ont été réalisés, le protocole « court » sur une durée de 4 mois (10 rats OP et 9 rats OR) et « long » sur une période de 12mois (14 rats OP et 9 rats OR) (Figure 38). Des mesures ont été réalisées « in vivo » puis « ex vivo » après le sacrifice des animaux.

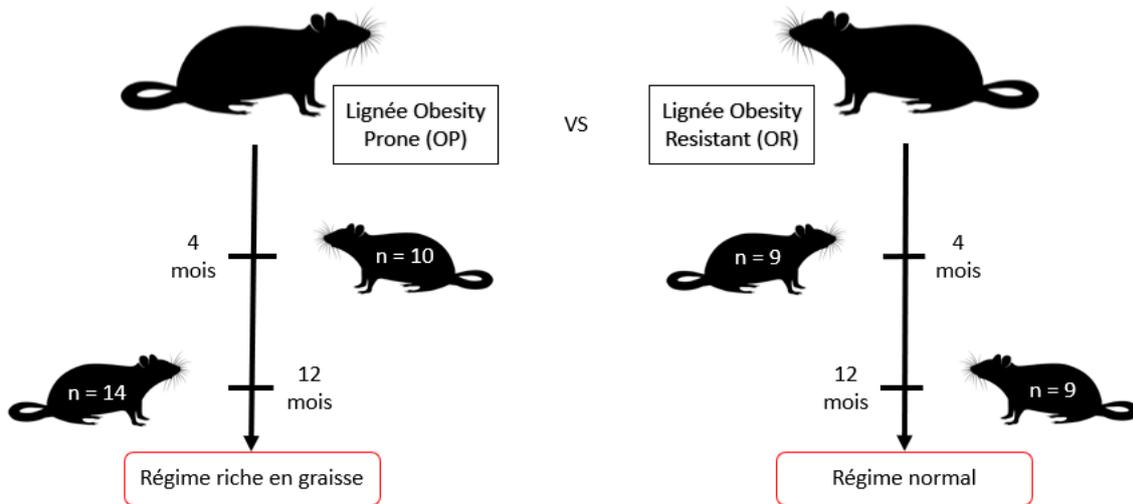


Figure 38 : Chronologie de l'étude¹

3.3.1. Confirmation du syndrome métabolique dans le modèle étudié

a) Obésité

Les rats OP avaient un apport calorique hebdomadaire supérieur aux rats OR (Figure 39).

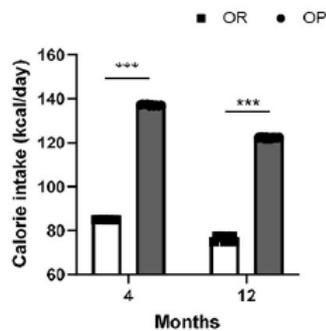


Figure 39 : Moyenne calorique absorbée par chaque groupe (en blanc les rats OR et en noir les rats OP à 4 et 12 mois) ; *** $p < 0,001$ pour les rats OP vs rats OR¹

En comparaison aux rats OR, les rats OP montraient de l'obésité abdominale (figure 40.a), un poids corporel supérieur (figure 40.b) et une accumulation de graisse viscérale (figure 40.c)

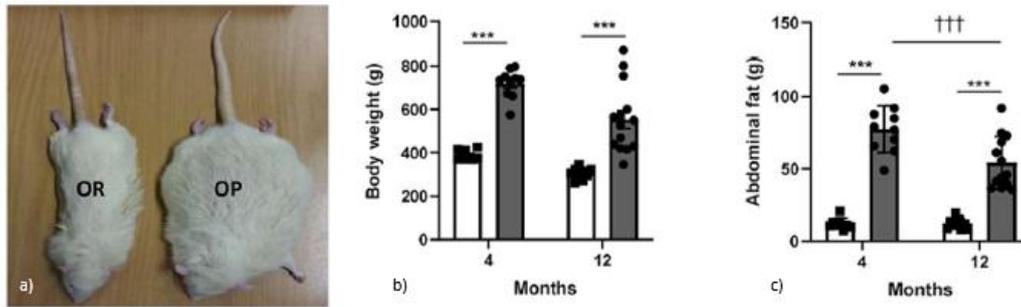


Figure 40 : (a) Illustration représentative d'un rat obese prone (OP) nourri avec un régime riche en graisse (à droite) vs un rat obese résistant (OR) nourri avec un régime normal (à gauche) à 12 mois (b) poids moyen de chaque groupe (en blanc les rats OR et en noir les rats OP à 4 et 12mois) (c) et leur mesure de graisse abdominale¹ ; ***p<0,001 pour les rats OP vs rats OR. ++p<0,001 pour les rats OP à 4 vs 12mois¹

b) Altérations du métabolisme énergétique et concentrations en adipokines

La glycémie à jeun restait normale mais les rats OP étaient intolérants au glucose. Après l'administration d'un bolus de glucose par voie intrapéritonéale, les rats OP avaient une glycémie significativement plus élevée que les rats OR à 30, 60, 90, 120 et 150min post-injection et une augmentation de l'aire sous la courbe reflétant la tolérance au glucose. (Figure 41)

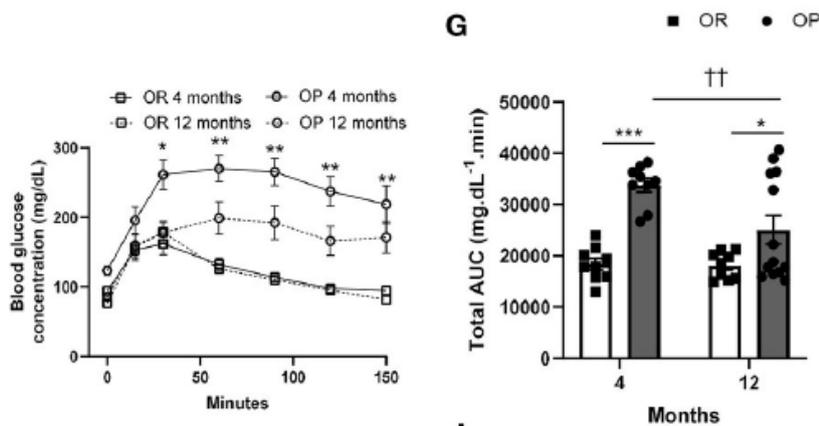


Figure 41 : Glycémie des rats obesity prone (OP) nourris avec un régime riche en graisse vs celle des rats obesity résistant (OR) nourris avec un régime normal à 4 et 12 mois durant un test de tolérance au glucose et son air total sous la courbe correspondante (Glucose AUC = Glucose Air Under the Curve). Les résultats sont exprimés en Moyenne ± SEM¹. *0,01<p<0,05 ; ***p<0,001 pour les rats OP vs rats OR. ++0,001<p<0,01 pour les rats OP à 4 vs 12mois

Les niveaux plasmatiques des triglycérides, du cholestérol total et du cholestérol présent dans les lipoprotéines à faible et forte densité étaient augmentés chez les rats OP dès 4mois, la dyslipidémie s'aggravant avec le temps, dans le modèle long (Figure 42).

	4 months			12 months			p 4- vs. 12-month high fat diet in OP rats
	Normal chow in OR rats (n = 8)	High fat diet in OP rats (n = 10)	p	Normal chow in OR rats (n = 8)	High fat diet in OP rats (n = 14)	p	
Triglycerides (in mg.dL ⁻¹)	90 ± 9	218 ± 27	***	131 ± 16	910 ± 136	***	†††
Total cholesterol (in mg.dL ⁻¹)	55 ± 2	109 ± 9	*	73 ± 4	214 ± 22	***	†††
HDL-cholesterol (in mg.dL ⁻¹)	44 ± 1	66 ± 5	**	54 ± 2	86 ± 6	***	††
LDL-cholesterol (in mg.dL ⁻¹)	10 ± 1	43 ± 7	***	19 ± 2	128 ± 19	***	†††
LDL/HDL ratio	0.23 ± 0.02	0.69 ± 0.14	*	0.35 ± 0.03	1.55 ± 0.20	***	†††

Figure 42 : Dosage des lipides plasmatiques chez les rats obesity prone (OP) nourris suivant un régime riche en graisse et les rats obesity résistant (OR) nourris suivant un régime normal à 4 et 12 mois. Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM¹. *0,01<p<0,05 ; **0,001<p<0,01 ; ***p<0,001 pour les rats OP vs rats OR. †0,01<p<0,05 ; ††0,001<p<0,01 ; †††p<0,001 pour les rats OP à 4 vs 12mois. HDL= High Density Protein ; LDL= Low Density Protein

Le tissu adipeux est un tissu endocrine produisant de hormones et cytokines dénommées adipokines, dont l'adiponectine et la leptine. Ces hormones participent à l'homéostasie du métabolisme énergétique. Une augmentation de la concentration plasmatique en leptine et du rapport leptine/adiponectine était observé chez les rats OP dans les protocoles court et long (Figure 43 a et b). Ces 2 paramètres étaient corrélés au poids corporel et à la graisse abdominale (Figure 43 c et d).

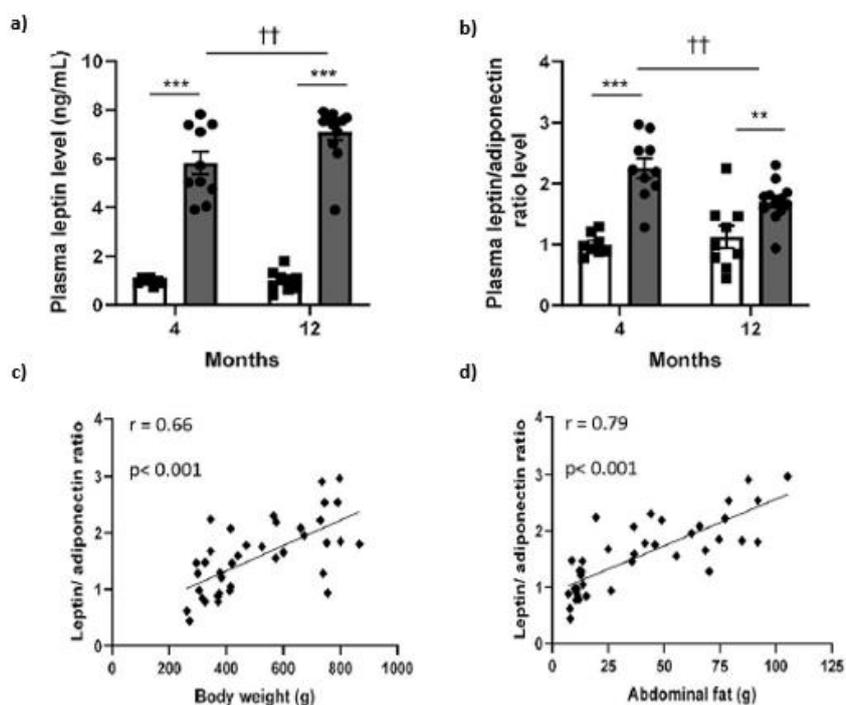


Figure 43 : (a) niveau plasmatique de leptine chez les rats OP (en noir) et les rats OR (en blanc) à 4 et 12mois, (b) rapporté au taux d'adiponectine des différents groupes, (c) en fonction du poids, (d) et de la masse de graisse abdominale. Les résultats sont exprimés en Moyenne ± SEM¹. *0,01<p<0,05 ; **0,001<p<0,01 ; ***p<0,001 pour les rats OP vs rats OR. †0,01<p<0,05 ; ††0,001<p<0,01 ; †††p<0,001 pour les rats OP à 4 vs 12mois

c) Pression artérielle

La pression systolique du ventricule gauche, reflétant en l'absence de sténose aortique la pression artérielle systolique, a été mesurée par cathétérisme chez les rats anesthésiés. Celle-ci n'a révélé aucune différence significative entre les rats OP et OR de 4 mois, mais après 12 mois, les rats OP ont développé une hypertension systémique systolique (Figure 44).

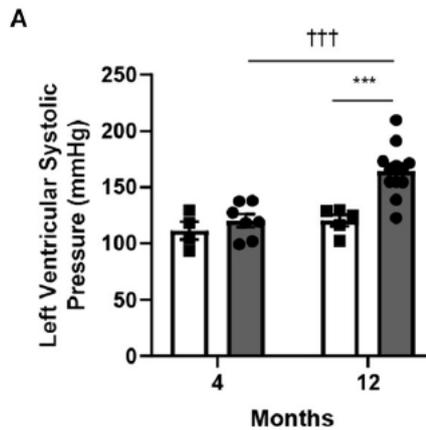


Figure 44 : Pression systolique dans le ventricule gauche chez les rats obesity prone (OP) nourris suivant un régime riche en graisse et les rats obesity resistant (OR) nourris suivant un régime normal à 4 et 12 mois. Les valeurs sont exprimées en Moyenne \pm SEM¹. ***p<0,001 pour les rats OP vs rats OR. †††p<0,001 pour les rats OP à 4 vs 12mois.

3.3.2. Développement d'une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Afin de démontrer le développement d'une ICFEp dans ce modèles, les critères suivants ont été étudiés : signes de décompensation cardiaque gauche, fraction d'éjection préservée, altérations morphologiques et/ou fonctionnels du VG suggérant une dysfonction diastolique.

a) Décompensation cardiaque gauche

Le cathétérisme cardiaque gauche a mis en évidence une augmentation de la pression de fin de diastole du VG. Cette augmentation de pression entraîne une augmentation de la pression veineuse pulmonaire, puis de la pression capillaire pulmonaire et un déséquilibre de la balance filtration réabsorption responsable de l'œdème pulmonaire, signe de décompensation cardiaque gauche congestive.

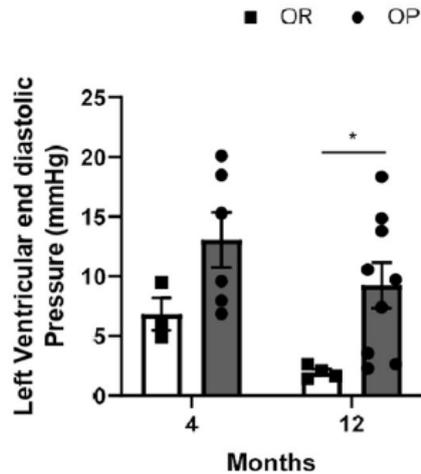


Figure 45 : Caractéristiques hémodynamiques des rats Obesity Prone (OP) nourris suivant un régime riche en graisse et des rats Obesity Resistant (OR) nourris suivant un régime normal à 4 et 12mois : pression diastolique du ventricule gauche des rats OP (en noir) et des rats OR (en blanc) à 4 et 12mois. Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM¹. *0,01<p<0,05 pour les rats OP vs rats OR.

b) Fraction de raccourcissement et d'éjection préservées

Par abord parasternal droit, une coupe transversale transventriculaire au niveau des cordages tendineux a été enregistrée en mode temps-mouvement, le curseur placé au centre du VG. Le diamètre du VG a été mesuré en fin de diastole et en fin de systole pour calculer la fraction de raccourcissement (FR) et la FE (par la formule de Teicholz) du VG (Figure 46)

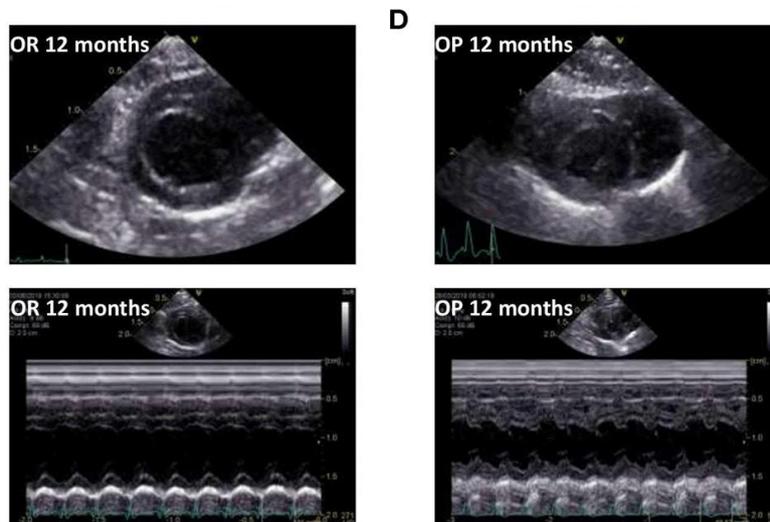


Figure 46 : Coupe transversale transventriculaire par abord parasternal droit en mode bidimensionnel et temps-mouvement chez un rat OR et chez un rat OP représentatifs. Le diamètre du VG est mesuré en fin de diastole et en fin de systole pour calculer la fraction de raccourcissement (FR) et la FE du VG¹.

Formules utilisées :

FS = (diamètre fin de diastole – diamètre fin de systole) / diamètre fin de diastole

Volume = $7 \cdot \text{diamètreVG}^3 / (2,4 + \text{diamètreVG})$

FE = (volume fin de diastole – volume de fin de systole) / volume de fin de diastole

Le tableau figure 47 montre que tant après 12 mois qu'après 4 mois, ces paramètres restaient inchangés

	4 months			12 months			p 4- vs. 12-month high fat diet in OP rats
	Normal chow in OR rats (n = 8)	High fat diet in OP rats (n = 10)	p	Normal chow in OR rats (n = 8)	High fat diet in OP rats (n = 14)	p	
Heart rate (in beats/min)	258 ± 13	257 ± 10	NS	227 ± 5	208 ± 8	NS	NS
Relative LV wall surface area	0.53 ± 0.01	0.52 ± 0.02	NS	0.54 ± 0.01	0.59 ± 0.02	*	††
LVEF (in %)	63 ± 2	68 ± 5	NS	63 ± 2	69 ± 3	NS	NS
FS (in %)	30 ± 1	34 ± 3	NS	30 ± 1	35 ± 3	NS	NS
LVIDd (in mm)	1.80 ± 0.04	1.77 ± 0.07	NS	1.78 ± 0.05	1.79 ± 0.08	NS	NS
LVRWT	0.42 ± 0.02	0.47 ± 0.03	NS	0.42 ± 0.02	0.51 ± 0.03	*	NS
Stroke volume (in mL)	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.02	NS	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.09	NS
Cardiac output (in mL/min)	15.3 ± 3.4	14.0 ± 1.3	NS	13.6 ± 0.4	13.2 ± 0.8	NS	NS

Figure 47 : Paramètres échographique deux-dimension et mode temps/mouvement de la structure et des fonctions du ventricule gauche chez les rats Obesity Prone (OP) nourris suivant un régime riche en graisse et des rats Obesity Resistant (OR) nourris suivant un régime normal à 4 et 12mois. Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM¹. *0,01<p<0,05 ; **0,001<p<0,01 ; ***p<0,001 pour les rats OP vs rats OR. †0,01<p<0,05 ; ††0,001<p<0,01 ; †††p<0,001 pour les rats OP à 4 vs 12mois. LV = Ventricule gauche ; LVEF = Fraction d'éjection du ventricule gauche ; FS = Fraction de raccourcissement ; LVIDd = Dimension interne du ventricule gauche en diastole ; LVRWT = Epaisseur relative de la paroi du ventricule gauche

c) Altérations morphologiques du VG

Echocardiographie

L'épaisseur relative des parois n'était pas modifiée significativement mais à 12 mois, on observait une augmentation de la surface relative des parois du VG (tableau figure 47) et une augmentation de la masse du VG (Figure 48) chez les rats OP par rapport aux rats OR.

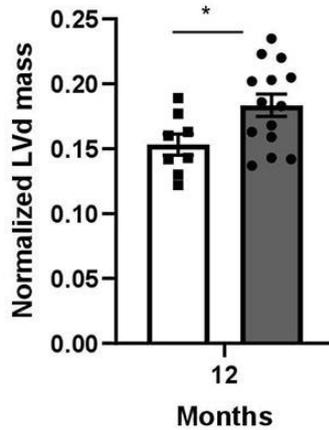


Figure 48 : Après 12mois les rats Obesity Prone (OP), nourris suivant un régime riche en graisses, montrent des altérations retrouvées dans la clinique de l'HFpEF. (A) Evaluation échocardiographie de la masse du ventricule gauche, normalisée à la longueur du tibia (en mm) chez les rats OP (barres noires) vs les rats Obesity Resistant (OR ; barres blanches) à 12mois. Les valeurs sont exprimées en Moyenne \pm SEM¹. *0,01<p<0,05 ; **0,001<p<0,01 ; ***p<0,001 pour les rats OP vs rats OR.

Autopsie

Le poids du cœur normalisé par rapport à la longueur du tibia était augmenté chez les rats OP à 4 mois et 12 mois (Figure 49.a). L'hypertrophie des parois du cœur était également visible sur les coupes histologiques (figure 49.b et c).

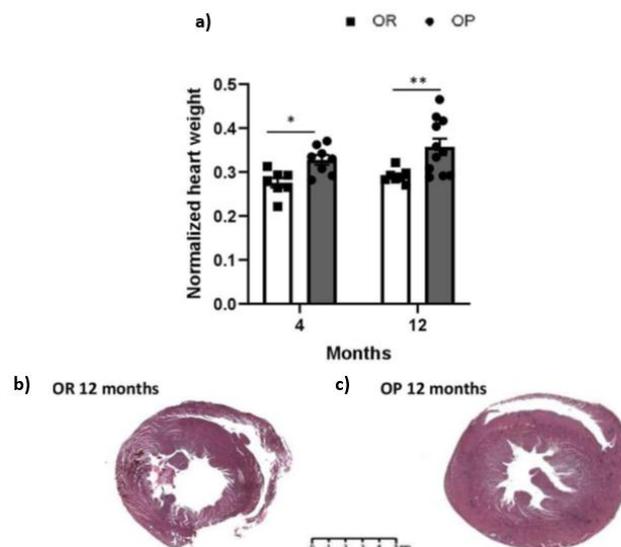


Figure 49 : (a) Ratio du poids du muscle cardiaque (en g) sur la longueur du tibia (en cm) chez les rats OP (barres noires) vs les rats OR (barres blanches) à 4 et 12mois. (b)(c) Représentation de coupes transversales de cœur (au niveau des ventricules) colorées au Trichrome de Masson d'un rat OP à 12mois vs d'un rat OR à 12mois. Echelle : 5mm. *0,01<p<0,05 ; **0,001<p<0,01 pour les rats OP vs rats OR.¹

d) Histologie : hypertrophie des cardiomyocytes et fibrose

Des colorations à l'hématoxyline éosine (Figure 50 a1 et a2), au trichrome de Masson (Figure 50 a3 et a4) et au Picosirius red (Figure 50 a5 et a6) ont été réalisées pour mesurer la taille des cardiomyocytes et pour évaluer la fibrose intersititielle et périvasculaire.

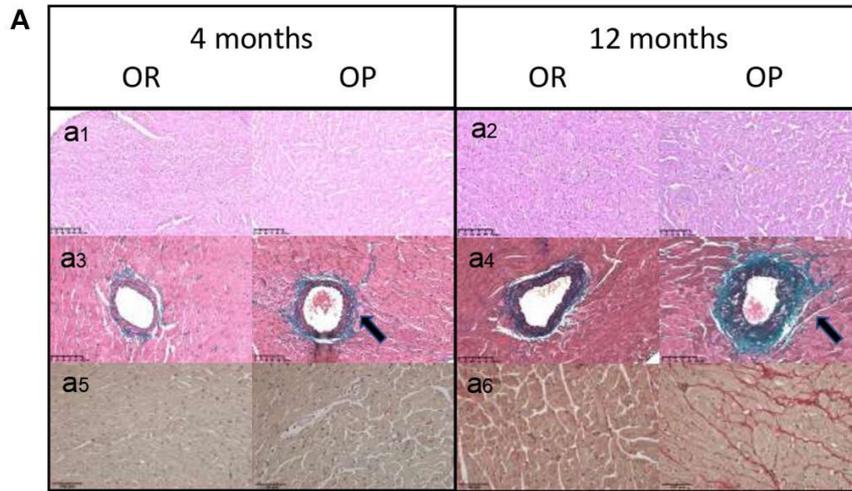


Figure 50 : Structures myocardiques, comprenant l'hypertrophie des cardiomyocytes et la fibrose, chez les rats Obesity Prone (OP) nourris suivant un régime riche en graisse et les rats Obesity Resistant (OR) nourris suivant un régime normal à 4 et 12mois. (A) Images représentatives de colorations à l'hématoxyline et l'éosine de section transversales du ventricule gauche (a1, a2). Images représentatives de coloration au Trichrome de Masson de vaisseaux dans le myocarde (a3,a4), les flèches montrent les fibres de collagène colorées en vert. Images représentatives de coloration au Picosirius Red de sections transversales du ventricule gauche, observées au microscope à lumière classique (a5, a6) et à lumière polarisée (a7, a8) et de vaisseaux du myocarde (lumière classique : a9, a10 et lumière polarisée : a11, a12). Echelle : 100µm.¹

La coloration au Trichrome de Masson révèle la présence d'une fibrose périvasculaire amplifiée après 12 mois chez les OP. La coloration au Picosirius red montre la fibrose interstitielle après 12 mois. La figure 51 montre l'augmentation de la surface des cardiomyocytes significative chez les OP après le protocole long.

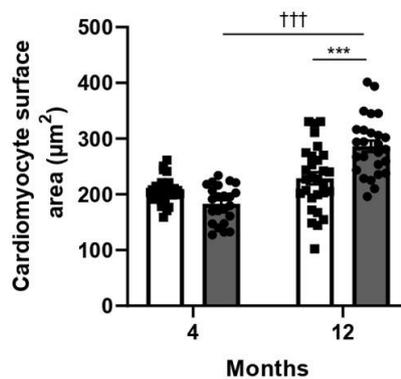


Figure 51 : Hypertrophie des cardiomyocytes (évaluée en air des cardiomyocytes en µm²) dans le ventricule gauche chez les rats Obesity Prone (OP ; barres noires) nourris suivant un régime riche en graisse et les rats Obesity Resistant (OR ; barres blanches) nourris suivant un régime normal à 4 et 12mois Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM¹. ***p<0,001, rats OP vs rats OR ; †††p < 0,001, rats OP à 4 vs 12 mois.

Objectif du travail

Lors d'hypertrophie cardiaque physiologique par exemple chez des individus sportifs, les cellules interstitielles telles que les cellules endothéliales ou les fibroblastes se modifient de manière dynamique afin de suivre les modifications du myocarde. Les études histomorphométriques, réalisées dans des modèles animaux d'hypertrophie cardiaque physiologique, montrent que la croissance du réseau capillaire est proportionnelle à celle des cardiomyocytes^{26,39,40}. Cette angiogenèse adaptative est indispensable au maintien de la perfusion et donc d'une fonction adéquate. D'autres études montrent qu'une hypertrophie disproportionnée par rapport au développement du réseau capillaire peut conduire à de l'hypoxie du myocarde et participer à la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque³⁹⁻⁴¹³⁹⁻⁴¹. Des études chez l'homme et dans différents modèles animaux montrent que contrairement à l'hypertrophie cardiaque physiologique, l'hypertrophie cardiaque pathologique, est associée à une diminution de la densité capillaire⁴². L'hypoperfusion qui en résulte peut participer à l'aggravation de la pathologie et mener à la décompensation cardiaque.

Dans le modèle murin d'ICFEp associée au syndrome métabolique, une hypertrophie du myocarde a été objectivée. Si l'hypertrophie n'est pas assortie d'une augmentation parallèle de la vascularisation, l'hypoxie relative induite par le remodelage pourrait participer à la pathogénie et à l'évolution de l'IC.

Les 2 objectifs de cette thèse étaient

- (1) D'évaluer la densité capillaire intramyocardique en parallèle à l'hypertrophie des cardiomyocytes dans le modèle précité par immunohistochimie quantitative ;
- (2) D'évaluer le niveau d'expression des facteurs pro-angiogéniques et de leurs récepteurs dans le modèle précité par PCR quantitative en temps réel (RTQ-PCR) après transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire

Matériel et méthode

Le protocole expérimental avait été préalablement approuvé par le Comité d'Ethique et de Bien-être Animal de la Faculté de Médecine de l'ULB sous le numéro 656N.

Le modèle utilisé a été préalablement décrit au point 3.3 de l'introduction. Des échantillons de cœur de rats OP et OR des protocoles court (4 mois) et long (12 mois) ont été utilisés. Les effectifs utilisés pour chacune des 2 méthodes sont explicitées dans la figure 52. Pour la RTQ-PCR, les tissus avaient été congelés dans l'azote liquide immédiatement après le prélèvement puis stockés à -80°C ; pour l'immunohistochimie, les tissus avaient été fixés 24h dans le formol puis conservés dans l'alcool avant d'être enrobés dans la paraffine (protocole présenté en annexe 2).

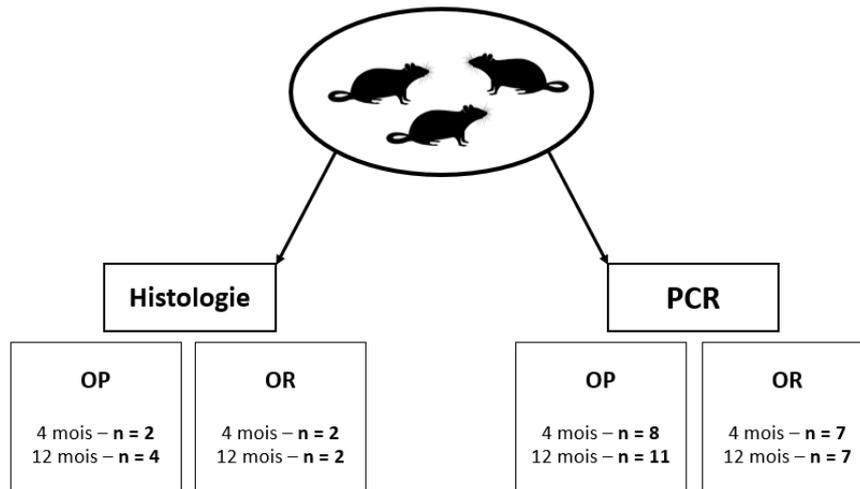


Figure 52 : Effectifs des rats pour l'histologie et la PCR Source personnelle

1. Immunohistochimie

1.1. Principe

L'immunohistochimie (IHC) repose sur la révélation en lumière visible (différence avec l'immunofluorescence) de la formation d'un complexe antigène/anticorps. Une enzyme conjuguée à l'anticorps va catalyser une réaction colorimétrique. Cette méthode est utilisée pour détecter et localiser une protéine membranaire, cytoplasmique ou nucléaire sur une coupe histologique.

1.1.1. Immunohistochimie indirecte

En immunohistochimie indirecte, la protéine d'intérêt est d'abord reconnue par un anticorps primaire spécifique, qui sera ensuite lui-même reconnu par un anticorps secondaire (dirigé contre l'anticorps primaire) qui permettra la révélation.

1.1.2. Méthode d'amplification ABC (Avidin-Biotin Complexe)

Dans la technique ABC (Avidin-Biotin Complexe), l'anticorps secondaire est biotinylé. Le troisième réactif est un complexe d'avidine, biotine et peroxydase. Dans ce cas, l'enzyme est fixée à deux molécules de biotine. Les deux biotines ayant un seul site de fixation pour l'avidine, vont pouvoir se fixer à deux molécules distinctes d'avidine. Ces dernières ont quatre sites de fixation pour la biotine, elles n'auront qu'un seul site de bloqué et pourront donc fixer d'autres molécules de biotine qui elles-mêmes seront conjuguées au marqueur et à une autre biotine, et ainsi de suite, créant ainsi un énorme complexe d'amplification.⁴³ (Figure 53)

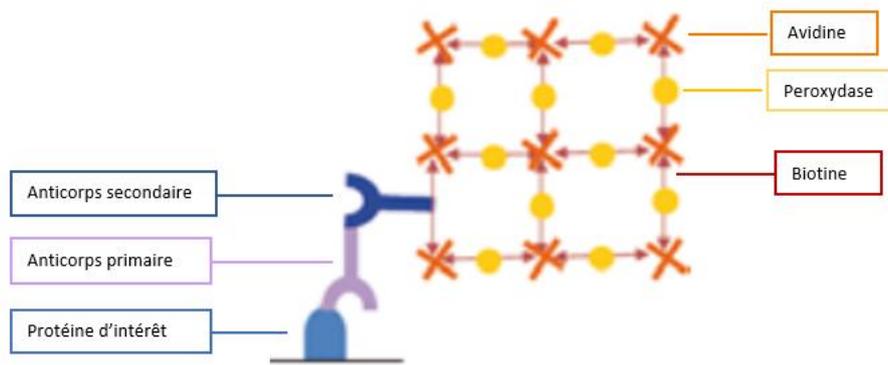


Figure 53 : Méthode d'amplification ABC⁴³

1.2. Protocole

Afin de visualiser les vaisseaux présents dans le muscle cardiaque, nous avons utilisé un marquage du CD31, protéine transmembranaire spécifique des cellules endothéliales. L'IHC réalisée est une IHC indirecte, utilisant la méthode d'amplification ABC expliquée précédemment et la révélation est réalisée par la réaction d'oxydo-réduction du 3,3'-diaminobenzidine (DAB) avec le peroxyde d'hydrogène, catalysé par la peroxydase du complexe ABC fixé à l'anticorps, produisant un précipité marron visible au microscope (Figure 54).

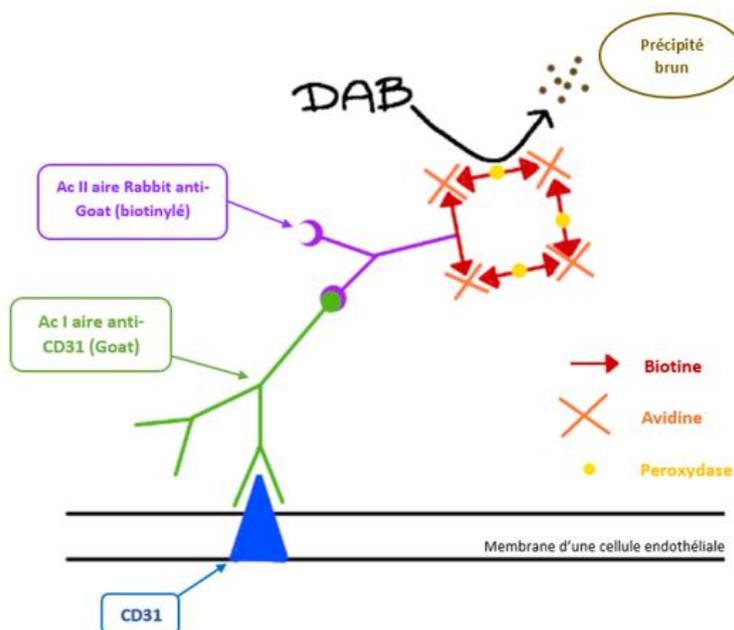


Figure 54 : IHC indirecte anti-CD31 avec révélation au DAB après amplification selon la méthode ABC ; Ac = Anticorps Source personnelle

Protocole détaillé : L'IHC est réalisée sur deux jours

Premier jour :

Entre chaque étape, l'excédent de réactif est enlevé autour des prélèvements à l'aide d'un papier filtre, limitant ainsi les dilutions

Déparaffinage : Les cœurs étant conservés dans un bloc de paraffine avant d'être découpés et posés sur une lame, il faut donc passer par une étape de déparaffinage. Celle-ci se fait par deux bains successifs au Toluol pendant 10min chacun.

Réhydratation : Il faut ensuite réhydrater les tissus progressivement par bains d'alcool de concentration décroissante : 5min dans du propan-2-ol 100%, 5 min dans de l'éthanol 90% puis 5 min de de l'éthanol 70%.

Inhibition de la peroxydase endogène : La révélation au DAB repose sur une réaction d'oxydation. Cependant les tissus possèdent des peroxydases déjà présente, qui pourraient réagir avec les réactifs. Afin de ne pas créer de réactions non voulues, une inhibition de toute autre peroxydase que celle introduite une fois le DAB fixé est réalisée. Cette étape est réalisée dans un bain composé de 200mL de méthanol, et 6mL d'H₂O₂ pendant 30min.

Rinçage : Afin d'évacuer toute trace de réactif du bain précédent, les lames sont trempées pendant deux fois 5min dans un bain de PBS (*Phosphate-Buffered Saline* un tampon phosphate salin) 1x

Application du stylo hydrophobe : afin d'éviter la dispersion des gouttes de réactifs et maintenir la concentration de ceux-ci autour du tissu, un stylo hydrophobe est utilisé pour délimiter la zone autour du tissu.

Blocage des sites non-spécifiques : Afin de limiter la fixation de l'anticorps secondaire sur des sites non-spécifiques autre que le CD31 présents sur l'endothélium, un blocage de ces sites est réalisé par l'application de Normal Rabbit Bloquing Serum (Dilution 1/10) pendant 1h à Temp ambiante en chambre humide.

Rinçage : Afin d'évacuer toute trace de réactif du bain précédent, les lames sont trempées pendant deux fois 5min dans un bain de PBS (*Phosphate-Buffered Saline* un tampon phosphate salin) 1x

Blocage de l'avidine endogène : L'avidine étant un réactif intervenant dans l'étape d'amplification, celle déjà présente dans les tissus va pouvoir se lier avec la biotine apportée, de manière non-souhaitée. L'avidine endogène va donc devoir être bloquée par l'utilisation de l'*Avidin blocking kit* (référence : SP-2001 ; Lot : ZJ0404) pendant 15min à température ambiante.

Rinçage : Afin d'évacuer toute trace de réactif du bain précédent, les lames sont trempées pendant deux fois 5min dans un bain de PBS (*Phosphate-Buffered Saline* un tampon phosphate salin) 1x

Blocage de la biotine endogène : La biotine étant un réactif intervenant dans l'étape d'amplification, celle déjà présente dans les tissus va pouvoir se lier avec l'avidine apportée, de manière non-souhaitée. La biotine endogène va donc devoir être bloquée par l'utilisation du *Biotin blocking kit* (référence : SP-2001 ; Lot : ZJ0404) sur les lames pendant 15min à température ambiante.

Eponger : Afin de ne pas diluer le prochain réactif dans la goutte du précédent, on enlève uniquement l'excès sans passer par une étape de rinçage.

Anticorps Primaire : Incubation des lames avec l'anticorps primage IgG anti CD31 (référence : af3628) dilution 1/100 en chambre humide pendant la nuit (environ 12h) à 4°C.

Les lames utilisées pour le contrôle négatif sont incubées avec un IgG Goat de dilution 1/10 000.

Deuxième jour :

Rinçage : Afin d'évacuer toute trace de réactif du bain précédent, les lames sont trempées pendant deux fois 5min dans un bain de PBS (*Phosphate-Buffered Saline* un tampon phosphate salin) 1x

Anticorps secondaire : Incubation des lames avec l'anticorps secondaire IgG Rabbit anti-Goat (Référence : BA-5000 ; Lot : ZH0420) de dilution 1/200 en chambre humide pendant 1h à température ambiante.

Préparation de la solution ABC : Pour cela on utilise le kit ABC (Référence : PK-6100 ; Lot : ZJ0419) que l'on va préparer 30min en avance afin de déjà former les complexes Avidine/Biotine avec la peroxydase. Pour cela nous préparons 5mL de PBS 10x auxquels nous allons rajouter 2 gouttes du réactif A. Nous mélangeons puis nous rajoutons 2 gouttes du réactif B avant de mélanger de nouveau et de mettre de côté.

Rinçage : Afin d'évacuer toute trace de réactif du bain précédent, les lames sont trempées pendant deux fois 5min dans un bain de PBS (*Phosphate-Buffered Saline* un tampon phosphate salin) 1x

Amplification selon la méthode ABC : Les lames sont incubées avec la solution ABC préparée précédemment pendant 30 min en chambre humide à température ambiante

Rinçage : Afin d'évacuer toute trace de réactif du bain précédent, les lames sont trempées pendant deux fois 5min dans un bain de PBS (*Phosphate-Buffered Saline* un tampon phosphate salin) 1x

Révélation par le DAB : En utilisant le kit DAB (Référence : SK-4100 ; Lot : ZH0309) qui consiste en 5mL d'eau bi-distillée, de 2 gouttes de buffer fourni dans le kit, de 4 gouttes de DAB puis de 2 gouttes de peroxyde d'hydrogène, la réaction catalysée par la peroxydase des complexes ABC liés va provoquer la précipitation d'un substrat brun qui va ainsi colorer les structures marquées. Cette étape sera réalisée pendant environ 10min à température ambiante, à l'abri de la lumière pouvant accélérer la réaction, avec un suivi en parallèle d'une lame afin d'apprécier l'intensité de la coloration en direct. Le DAB étant un produit cancérigène, l'utilisation de gants est requise.

Rinçage à l'eau courante : pendant 5min afin de stopper la révélation au DAB une fois l'intensité de la coloration satisfaisante.

Rinçage à l'eau bidistillée pendant 5min

Contre coloration à hématoxyline de Gill : pendant 30sec afin de visualiser les autres cellules (cardiomyocytes notamment)

Rinçage à l'eau courante : pendant 5min afin d'éliminer l'excès d'hématoxyline et stopper la coloration

Déshydratation : On plonge les lames dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70%, 90%, 100% puis Toluol) pendant 5min chacun.

Montage des lames : Le montage des tissus entre lame et lamelle est réalisé à l'aide d'une colle de montage DPX.

Voici un exemple de la coloration obtenue (Figure 55), qui nous servira de support pour la quantification.

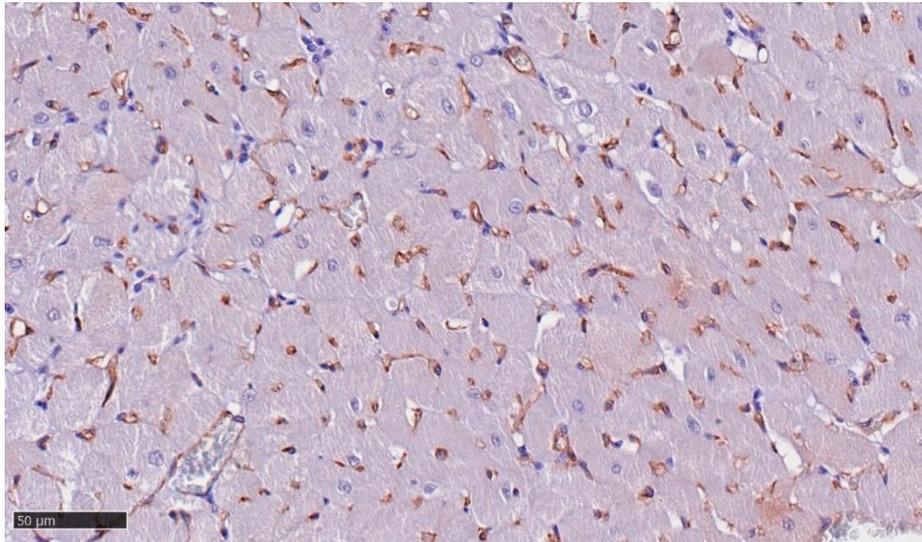


Figure 55 : Exemple de coloration IHC dans la région sous endocardique du cœur du rat C16. Source personnelle

Un contrôle positif est réalisé sur une coupe transversale d'artère du membre thoracique de rat et le contrôle négatif sur une coupe de myocarde de rat (Figure 56).

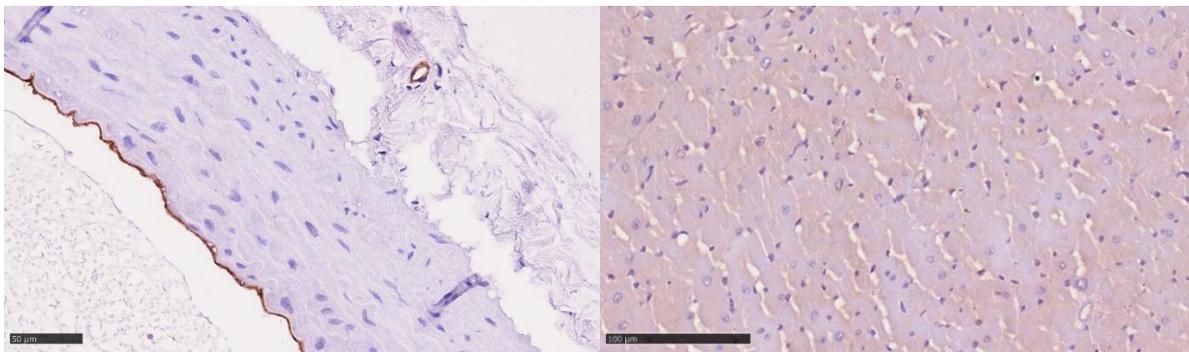


Figure 56 : Contrôle positif du protocole d'IHC sur une artère thoracique de rat, et contrôle négatif sur une coupe de myocarde de rat Source personnelle

1.3. Quantification

Une fois montée et sèches, les lames ont ensuite été numérisées, et lues avec le logiciel NDP.View. A partir des numérisations, nous avons sélectionnées un échantillon d'images dans le myocarde en région sous-péricardique et sous-endocardique. Les critères de sélection des images étaient : une bonne coloration, sans trop de zones de vide, avec les cardiomyocytes en section transversale.

Les images ont ensuite été importées sur le logiciel QuPath afin de réaliser les comptages des cardiomyocytes, des capillaires (critère : $<10\mu\text{m}$) et des plus gros vaisseaux ($>10\mu\text{m}$) (Figure 57). Les rapports nombre de capillaires / nombre de cardiomyocytes ont ensuite été calculés et comparés. Les plus gros vaisseaux n'ont pas été exploités.

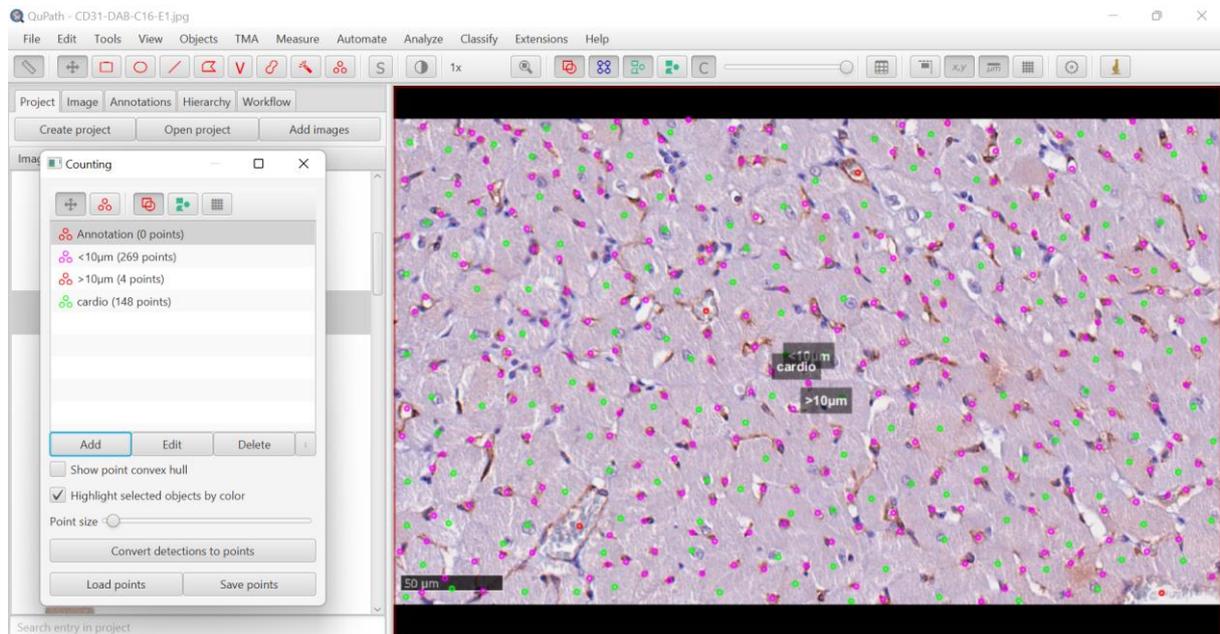


Figure 57 : Capture d'écran du comptage réalisée sur le logiciel QuPath Source personnelle

2. RT-qPCR

2.1. Principe

PCR « classique » :

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier de manière exponentielle une séquence spécifique d'ADN. Elle repose sur une réaction biochimique de synthèse d'ADN réalisée *in vitro* de manière répétée. Cette synthèse d'ADN repose sur la transcription du fragment qui nous intéresse grâce à des amorces (ou *Primers*) spécifique d'une séquence présente sur le gène d'intérêt.

Chaque cycle de PCR s'effectue en 3 étapes (Figure 58) :

- a) Dénaturation thermique de l'ADN à 95°C : elle permet de rompre les liaisons hydrogènes entre les deux brins d'ADN et de les séparer.
- b) Hybridation des amorces entre 50°C et 65°C : les amorces correspondantes à la séquence d'intérêt vont s'hybrider à leur séquence complémentaire de l'un des deux brins d'ADN
- c) Elongation à 90°C : la Taq polymérase (ADN polymérase) va catalyser la réplification des ADN amorcés de façon sélective.

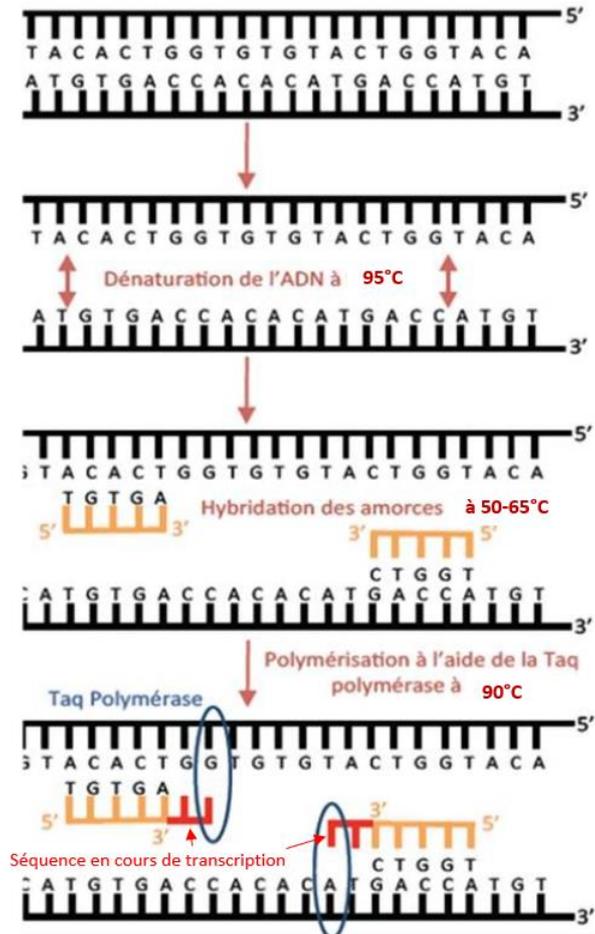


Figure 58 : Déroulement d'un cycle de PCR (adapté de⁴⁴)

La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur dans lequel les plaques avec les puits réactionnels sont placées. Celui-ci va répéter les différentes étapes du cycle de manière automatique en faisant varier les températures suivant un programme choisi.

Transcription inverse :

La transcription inverse est une étape supplémentaire précédant la PCR lorsque le matériel de départ est de l'ARN. Elle consiste à rétro transcrire l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) monobrin en utilisant une transcriptase inverse, des désoxyribonucléotides (dNTPs) et un mélange d'amorces aléatoires (Figure 59)

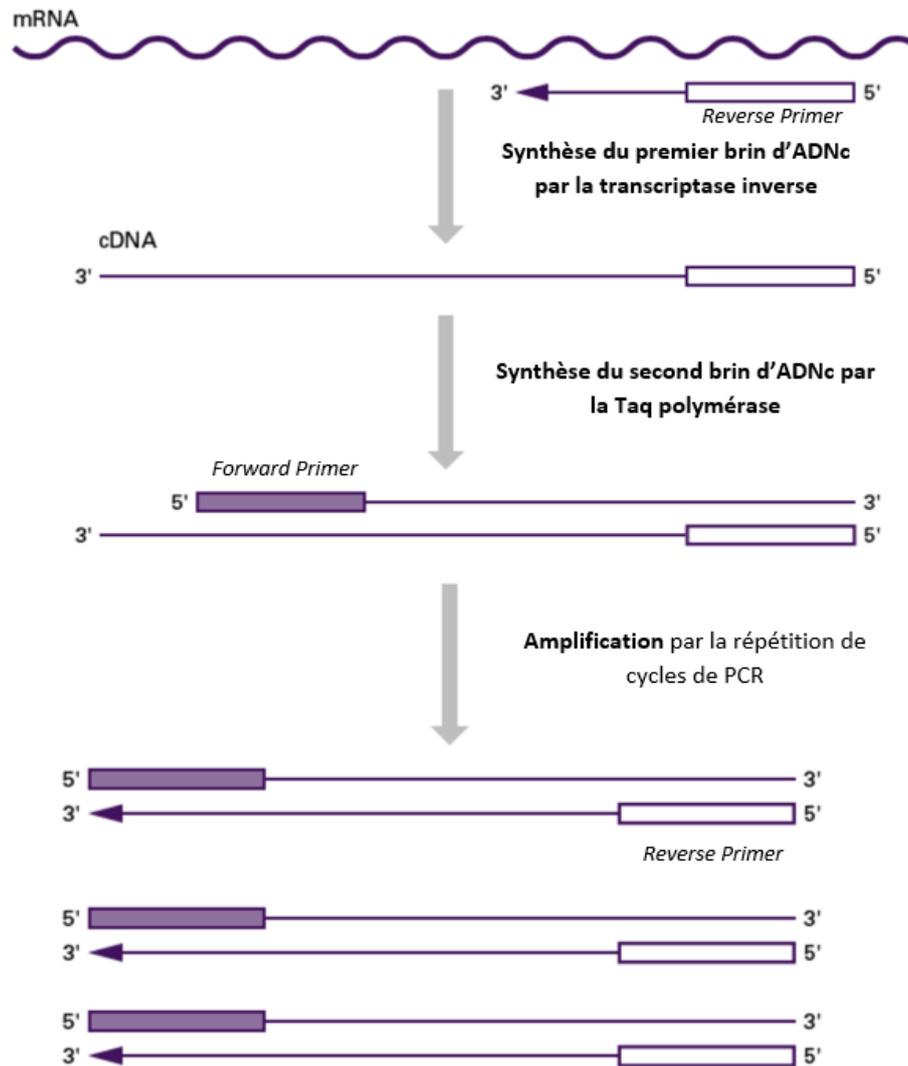


Figure 59 : Principe de la RT-PCR⁴⁵

PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) :

La RT-qPCR est une PRC qui permet de suivre l'amplification exponentielle du fragment d'intérêt (provenant d'un gène étudié ou d'un gène de référence) cycle par cycle. Les fragments amplifiés sont détectés à chaque cycle par un agent intercalant, le SybrGreen, qui a la propriété de devenir fluorescent lorsqu'il se lie à une molécule d'ADN double brin. L'intensité du signal fluorescent va être mesurée, elle est directement corrélée à la quantité d'ADN double brin (donc d'ADNc transcrit). (Figure 60)

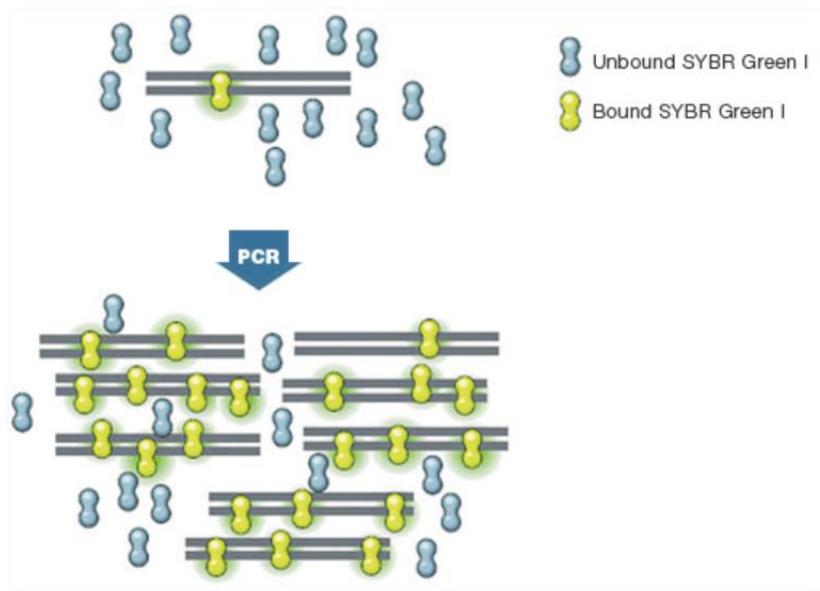


Figure 60 : Utilisation du SybrGreen pour la RT-qPCR⁴⁶

Au cours de la RT-qPCR, nous nous intéressons au cycle seuil (ou CT pour cycle treshold) qui correspond au nombre de cycles nécessaire pour atteindre une intensité du signal fluorescent supérieure au bruit de fond. Au CT, l'ADNc provenant de l'ARN d'intérêt présent dans l'échantillon est détecté. Plus l'ARN d'intérêt était présent en grande quantité dans l'échantillon, plus vite son amplification permet de le détecter, plus son CT est petit, et inversement (Figure 61)

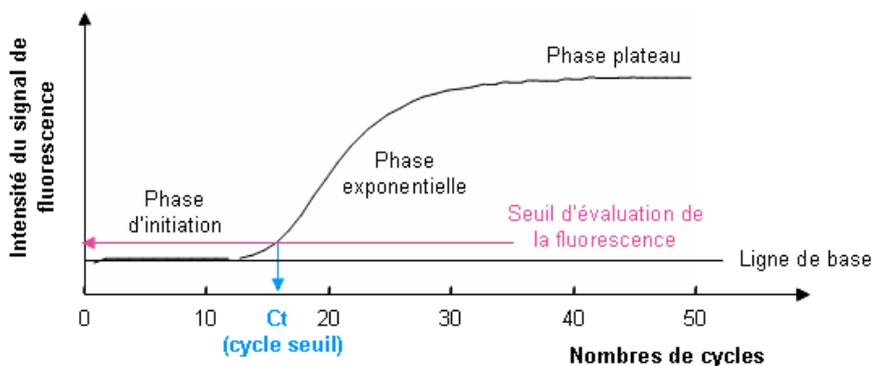


Figure 61 : Définition graphique d'un cycle seuil⁴⁷

Mais le CT dépend également de la quantité d'ADNc total placé dans chaque puit. Pour éliminer ce facteur de variation, il faut mesurer la concentration de l'ARN extrait (cf 2.2.1), diluer chaque échantillon pour atteindre la même concentration, mettre le même volume d'échantillon dans chaque puit et normaliser le résultat par rapport à un ou plusieurs gènes de référence.

Un gène de référence ou gène ménage est un gène dont l'expression est stable dans le tissu étudié (ou dans les tissus étudiés) et ce quelle que soit la condition expérimentale.

Les gènes de référence utilisés dans cette étude sont les gènes codants pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase-1 (HPRT-1) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), ce

sont deux enzymes intervenant respectivement dans la voie de sauvetage des purines et la glycolyse qui sont deux réactions présentes dans l'ensemble des cellules.

2.2. Protocole

2.2.1. Extraction d'ARN

Traitement du tissu : Afin de préserver au mieux l'ARN, le tissu est prélevé rapidement après la mise à mort et est immédiatement plongé dans de l'azote liquide avant d'être conservé à -80°C. Les échantillons de taille importantes sont broyés mécaniquement (pilon et mortier) pour obtenir une poudre, le tout dans de l'azote liquide afin de ne pas casser la chaîne du froid. La poudre ainsi obtenue est divisée en lots de 0,1g et stockée dans des Eppendorf à fond ronds pouvant être stockés à -80°C.

Dégradation du tissu : Dans un de ces Eppendorfs contenant 0,1g de tissu broyé, nous ajoutons 500µL de Trizol ou acide de guanidinium thiocyanate-phénol-chloroforme (sous hotte) et une bille métallique stérile. Les Eppendorfs sont ensuite placés dans un broyeur à bille, le TissueLyser, qui va permettre une destruction mécanique par agitation rapide (30 agitations/seconde).

Extraction de l'ARN : Après avoir vérifié que le tissu a bien été désintégré (dans le cas contraire, un deuxième cycle dans le TissueLyser est nécessaire), le mélange est centrifugé pendant 5 secondes. Les protéines dénaturées par le thiocyanate de guanidinium sont dissoutes dans le phénol au fond du tube, les lipides sont dissous dans le chloroforme (interphase) et le surnageant (phase aqueuse) contenant les acides nucléiques (ARN et ADN) est transvasé dans un nouvel Eppendorf. On y ajoute 100µL de chloroforme 100% froid (conservé à -20°C). Les échantillons sont vortexés durant 15 secondes jusqu'à obtenir un liquide blanchâtre. On centrifuge ensuite pendant 30 minutes à 4°C à 15 000 g. La phase supérieure (transparente) contenant l'ARN est transvasée dans un nouvel Eppendorf, en faisant bien attention à ne pas prendre l'anneau blanc contenant l'ADN. On y ajoute ensuite 300µL d'éthanol 70% à froid, conservé à -20°C. On vortexe puis on centrifuge brièvement.

Purification de l'ARN : La purification est réalisée avec le kit d'extraction QUIAgen RNease (référence mini kit 74104). En utilisant les colonnes numérotées du kit, on distribue le contenu de l'Eppendorf dans une colonne en silice qui va adsorber l'ARN. Après centrifugation, on jette le liquide de la partie inférieure avant de remettre la colonne en place.

Les étapes suivantes permettent de laver et éliminer toutes les traces et résidus d'ADN et protéines.

- On ajoute 350µl de tampon RW1 (fourni dans le kit) avant de centrifuger et jeter le liquide de la partie inférieure.

- On ajoute 80µl de solution de travail DNase ; préparée en utilisant le kit QUIAgen DNase (référence 79254) ; directement sur la membrane. On laisse incuber à température ambiante pendant 15min avant de rajouter 350µL de tampon RW1, centrifuger et jeter le liquide de la partie inférieure.

- On ajoute 500µl de tampon RPE (fourni avec le kit mais concentré, il faut le diluer en ajoutant 4 volumes d'éthanol pur avant la première utilisation) puis on centrifuge avant de jeter le liquide de la partie inférieure. Cette étape est réalisée 2x.

Finalement, l'ARN est récupéré par élution en disposant 20µl (volume adapté en fonction de la concentration en ARN des premiers échantillons) d'H₂O RNase free au centre et sur le fond de la colonne. On laisse poser 1 min avant de centrifuger. L'éluat est conservé sur glace.

Concentration de l'ARN : La concentration obtenue est mesurée au Nanodrop, un spectrophotomètre pour micro volumes (l'H₂O RNase free utilisée précédemment sert de blanc).

Vérification de l'intégrité de l'ARN : Afin de vérifier que l'ARN ne se soit pas dégradé lors des processus de conservation et d'extraction, une migration sur gel est réalisée. Si l'ARN est intact, 2 bandes d'ARN doivent être mises en évidence, correspondant à l'ARN ribosomique 18s et 28s.

Stockage des échantillons : Les Eppendorfs sont étiquetés et conservés à -80°C.

2.2.2. Choix et validation des amorces

Les amorces sont conçues selon les critères suivants :

- Elles doivent idéalement être sur deux exons de la séquence de l'ARNm, permettant l'amplification de l'ARN complémentaire du gène d'intérêt afin d'éviter les risques de faux positifs dus à l'amplification d'ADN (génomique) contaminant contenu entre ces deux exons (ADN non codant)
- Les deux amorces doivent être espacées, part un intron de minimum 1 000 paires de bases.

Les séquences des gènes d'intérêt sont recherchées sur PubMed. Les amorces sont ensuite sélectionnées avec l'outil PrimerBlast selon les critères énoncés ci-dessus avant d'être commandées sur le site EuroGenTec.

Les amorces utilisées lors de cette thèse sont présentées dans le tableau suivant (Figure 62) :

Gène reconnu	Amorce Forward	Amorce Reverse
VEGFa	5' – tgcactggaccctggctta – 3'	5' – ttctgctccccttctgtcgt – 3'
VEGFd	5' – aaatgtatggagagtgggccg – 3'	5' – accgggatgatcgctcaaaa – 3'
VEGFR-1 (Flt-1)	5' – gctccacgaccttagactgt – 3'	5' – cgtgctgtttcctggctcctaa – 3'
VEGFR-2 (Kdr)	5' – gcgggaaactacacggtcat – 3'	5' – ctttctcaccgatctggggt – 3'
Ang-1	5' – agtcataacctgtcagcctt – 3'	5' – catctgcacagtctcgaatgg – 3'
Ang-2	5' – gcacaaactcggaactgact – 3'	5' – tgttgaagaagctgcaactcg – 3'
Tie-2	5' – tcaagaaggatgggttacgg – 3'	5' – ttctctgcaaagtcctgt – 3'
HIF-1α	5' – cagaggaagcgaaaaatgga – 3'	5' – acatagtaggggcacggtca – 3'

Figure 62 : Liste des amorces utilisées

Validation des amorces

- Réalisation de la courbe d'étalonnage

Chaque réaction de PCR, avec un couple d'amorces donné dans un tissu donné, possède une efficacité qui lui est propre et qui doit être vérifiée. L'étape de validation des amorces consiste à réaliser une RTq-PCR à partir d'un échantillon du tissu étudié progressivement dilué de 10 en 10 (Annexe 3). Nous obtenons une courbe d'étalonnage avec en abscisse le logarithme des différentes dilutions de l'échantillon de départ et en ordonnées les CT. La pente de la courbe d'étalonnage nous indique l'efficacité (ou l'efficience) de la réaction.

- Analyse de la courbe d'étalonnage

L'efficience est calculée à partir de la pente de la courbe d'étalonnage par la formule :

$$\text{Efficience (\%)} = ([10^{(-1/\text{slope})}] - 1) \times 100$$

Idéalement, l'efficience doit être de 100%, c'est-à-dire, à chaque cycle de PCR, la quantité d'ADN double, ce qui correspond à une pente de -3,32 ($= -1/\log 2$). Une faible efficience peut être due à une mauvaise sélection des amorces ou à des conditions de réaction d'amplification sub-optimales. Une efficience supérieure à 100% peut indiquer une erreur dans les dilutions, le pipetage ou la co-amplification de produits non spécifiques. Nous essayons d'obtenir pour chaque couple d'amorces une efficience comprise entre 95% et 105%.

Enfin, le coefficient de détermination de la régression linéaire ou R^2 doit être proche de 1, celui-ci est une mesure statistique de la proximité des données à la droite de régression ajustée.

- Courbe de fusion

On vérifie également que la courbe de fusion présente un pic unique. La courbe de fusion est une étape réalisée à la fin de la réaction d'amplification. La température est augmentée progressivement l'ADN double brin se dénature et devient simple brin, la fluorescence diminue. La pente de chute de fluorescence est suivie, la température de fusion (pic de chute de fluorescence) dépend de la taille du produit amplifié ou amplicon et de sa composition en bases. Si un seul produit est amplifié, nous devons avoir un seul pic de fusion correspondant à la dénaturation de l'amplicon spécifique.

Cette étape est réalisée non seulement lors de la validation des amorces mais également à la fin de chaque RTq-PCR du protocole.

2.2.3. RT-qPCR

Chaque échantillon est réalisé en triplicat, ou double pour certains. Dans chaque puit de la plaque PCR nous allons mettre :

- 12,5 μL de SybrGreen

- 2 µL d'amorce Forward
- 2 µL d'amorce Reverse
- 8,5 µL de l'échantillon à amplifier en suivant le plan de plaque (Figure 63)

Le contrôle négatif est réalisé avec de l'eau DNase free.

Plaque Cœur												
Gene	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C01 OP 4m			C13			C67			C80		
B	C02			C14			C69			C81		
C	C03			C18			C70			C82		
D	C04			C19			C71			C83		
E	C07			C20			C72			C85		
F	C08			C62 OP 12m			C73			C86		
G	C09			C64			C10OP4m		C76		C78	
H	C12			C66			C11 OR 4m		C77		CTRL-	

Figure 63 : Plan de la plaque PCR.

La plaque est placée dans le I-Cycler qui va réaliser les cycles PCR et transmettre les résultats d'amplification en temps réel.

Les données (les cycles seuils) sont exportées sur Excel, puis l'expression relative du gène va être calculée et normalisée avec deux gènes de références (HPRT1 et GAPDH) selon la méthode Pfaffl.

3. Analyses statistiques

Le test de Student ou test t, non païré et bilatéral, a été utilisé pour vérifier si les moyennes des deux groupes étaient similaires ou différentes.

L'hypothèse nulle (H0) signifie que les deux groupes sont identiques et qu'aucune différence significative existe entre ces groupes. Ce test prouvera ou rejettera l'hypothèse nulle. Si H0 est rejetée, cela signifie que H1 est validée. H1 signifie qu'une différence entre les deux groupes est observée.

La p value (p) est la probabilité qu'un résultat se produise par hasard, elle varie entre 0 et 1. Plus elle est proche de 0, plus la probabilité de faire une erreur en rejetant l'hypothèse nulle est faible, autrement dit, il y a peu de chance que le résultat se produise par hasard.

Un seuil alpha pour la valeur de p détermine si le résultat d'une étude peut être considéré comme statistiquement significatif ou non. Ce seuil a été défini à 0,05 (5%).

Si $p < 0,05$ on considère que le résultat est significatif. L'hypothèse nulle est rejetée, H1 est retenue, les 2 groupes sont différents et la probabilité que ce résultat soit dû au hasard est de 5%. Si $p > 0,05$, la différence entre les 2 groupes est considérée non significative. Les données sont présentées en moyenne (+ valeurs individuelles) et erreur standard sur la moyenne (SEM).

Légendes utilisées pour cette étude :

* ou † : $p < 0,05$

** ou †† : $p < 0,01$

*** ou ††† : $p < 0,001$

Résultats

1. Quantification des capillaires dans le myocarde

1.1. Reproductibilité de la méthode

Le comptage des capillaires, des cardiomyocytes et le calcul de leur rapport (densité capillaire) ont été réalisés par 2 observateurs indépendants (Mathilde Doppler et Grégory Vegh) sur 9 champs différents provenant d'un rat OR et d'un rat OP. Les coefficients de variation inter-observateurs sont respectivement de 3,5%, 6,2% et 4,4%.

1.2. Densité capillaire

Les rats OP, présentent dès 4 mois un rapport capillaires/cardiomyocytes diminué en comparaison des rats OR. Cette différence est mise en évidence en région sous-endocardique et sous-péricardique et confirmée dans le protocole long, après 12 mois de régime hypercalorique (Figures 64 et 65). Cela suit la tendance que l'on a pu observer visuellement à l'échelle microscopique entre deux zones similaires de rats OP et OR à 12 mois (Figure 66).

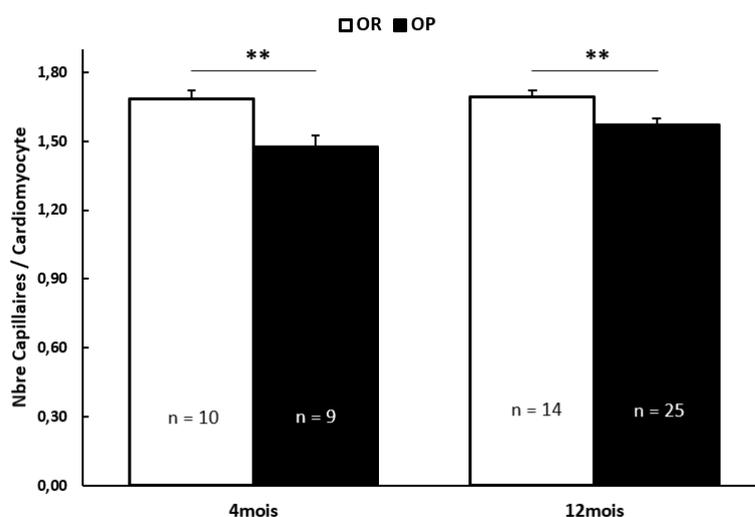


Figure 64 : Nombre de capillaires par cardiomyocyte dans la région sous-endocardique chez les rats OP vs les OR à 4 et 12 mois. n = nombre d'images; les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; ** $p < 0,01$

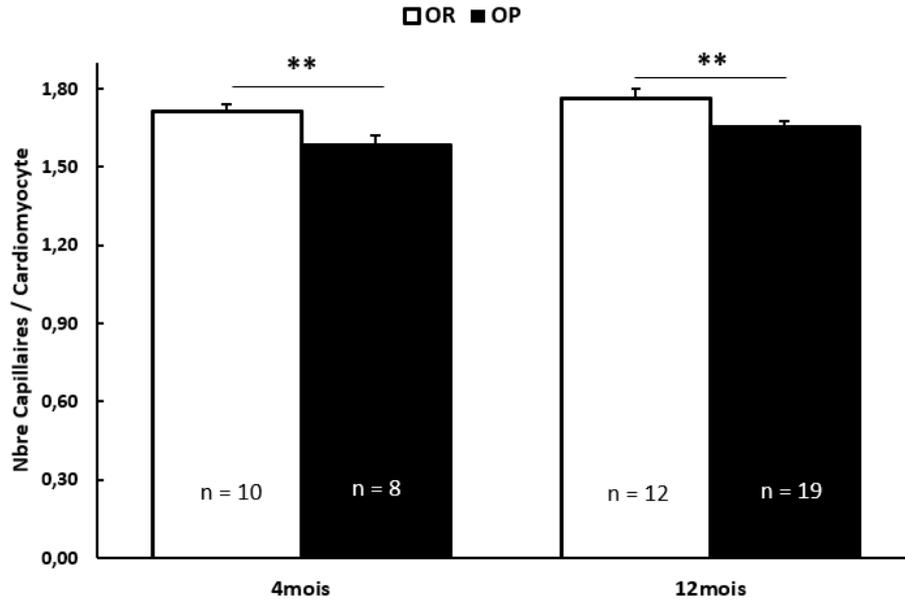


Figure 65 : Nombre de capillaires par cardiomyocyte dans la région sous-péricardique chez les rats OP vs les OR à 4 et 12 mois. n = nombre d'images; les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; **p<0,01

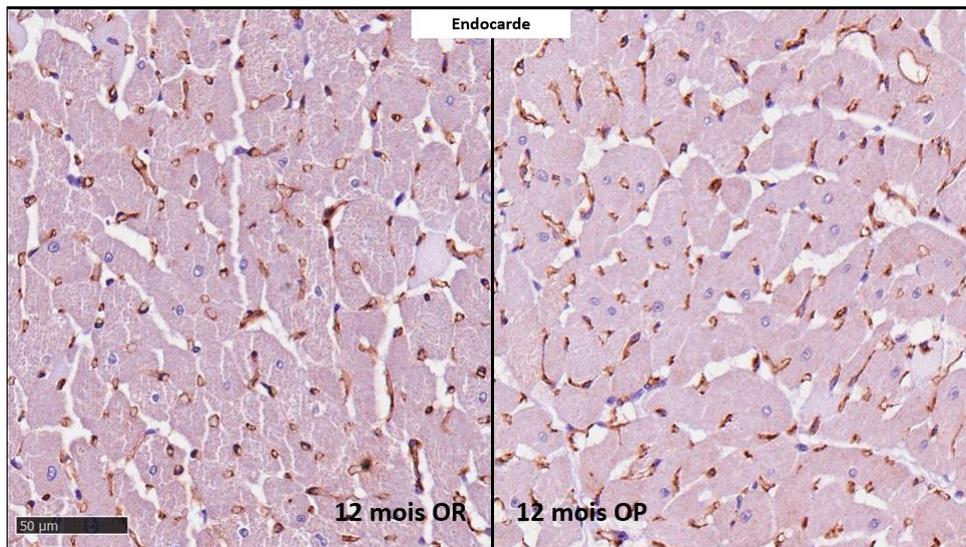


Figure 66 : Comparaison visuelle de la densité capillaire dans deux champs (rat OP et OR à 12 mois, à la même échelle) provenant du pilier du ventricule gauche. Echelle = 50 μ m

2. Expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse

2.1. Validation des amorces

Des courbes d'étalonnage ont été réalisées pour valider les amorces de VEGF-A, VEGF-D et KDR. La figure 67 montre la courbe d'étalonnage de chaque couple d'amorces. Les efficacités respectives de ces couples étaient de 101%, 96,31% et 97,79%.

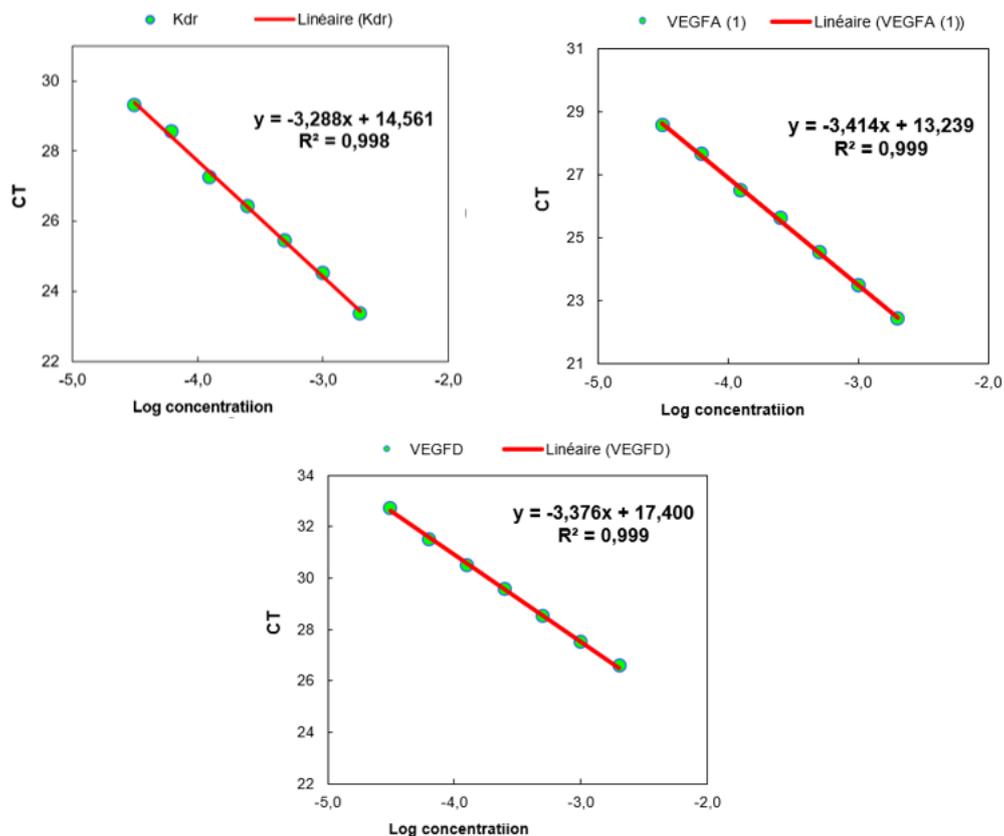


Figure 67 : Courbes d'étalonnage des couples d'amorces pour KDR, VEGF-A et VEGF-D.

Sur la figure 68 on peut observer les courbes de fusion de deux couples d'amorces qui ont été testés pour le gène VEGF-A. Les deux présentent bien un pic de fusion marqué autour de 81°C, cependant on peut observer sur la première la présence d'un deuxième pic vers 73°C, qui ici correspondait à la formation de dimères d'amorces. Le couple d'amorces correspondant à la figure de droite a été sélectionné pour l'étude.

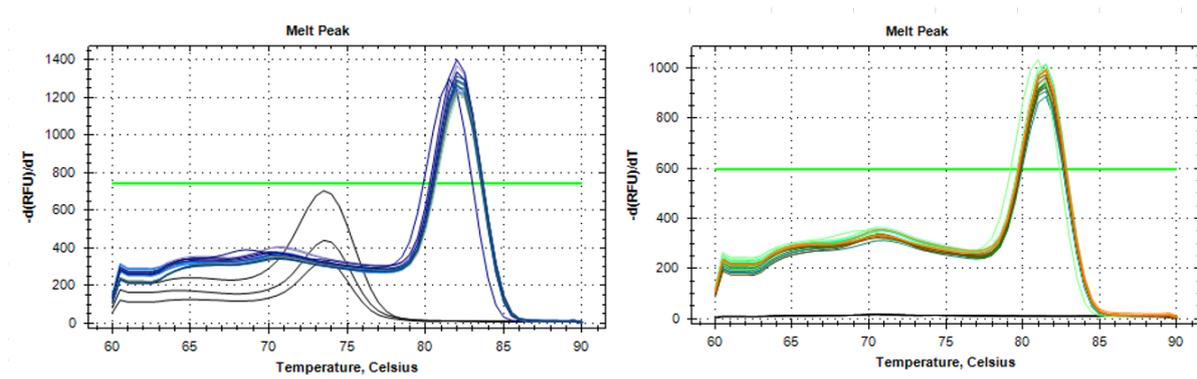


Figure 68 : Exemple de courbes de fusion de deux couples d'amorces testées pour le gène VEGF-A

2.2. Expression de VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-1 et VEGFR-2

L'expression des deux facteurs pro-angiogéniques VEGF-A (agoniste des récepteurs Flt-1 et KDR) et VEGF-D (agoniste du récepteur KDR) est augmentée chez les rats OR à 12 mois par rapport à celle des mêmes rats OR à 4 mois. Cette augmentation d'expression liée à l'âge n'est pas visible chez les rats OP. A 12 mois, VEGF-A et VEGF-D sont moins exprimés chez les rats OP que chez les rats OR du même âge (Figure 69).

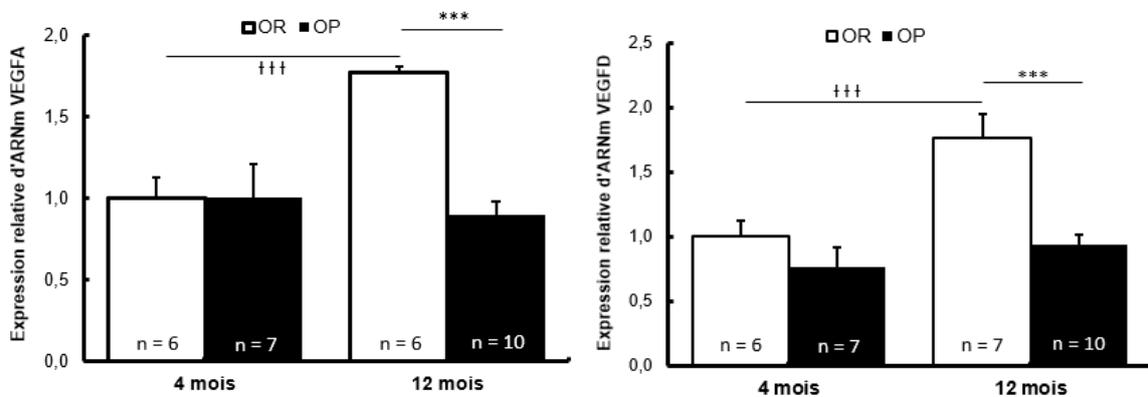


Figure 69 : Expression relative des gènes codant pour les protéines VEGF-A et VEGF-D chez les rats OP et OR à 4 et 12 mois. n = nombre d'individus ; les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; ***p<0,001 pour les rats OP vs les rats OR, †††p<0,001 pour les rats OR à 4 vs 12 mois.

On observe la même évolution pour les deux récepteurs au VEGF : le Flt-1 ou VEGFR-1 et le KDR ou VEGFR-2 qui interviennent respectivement lors des phases de bourgeonnement et d'élongation (Figure 70).

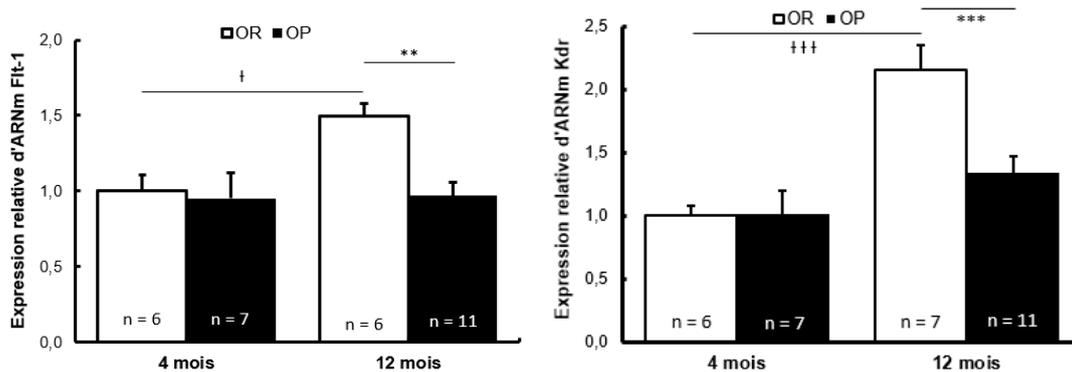


Figure 70 : Expression relative des gènes codant pour les protéines Flt-1 (ou VEGFR-1) et KDR (ou VEGFR-2) chez les rats OP et OR à 4 et 12 mois. n = nombre d'individus ; les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ pour les rats OP vs les rats OR ; † $p < 0,05$ et †† $p < 0,001$ pour les rats OR à 4 vs 12 mois.

2.3. Expression de Ang1, Ang2 et Tie-2

Les expressions de Ang-1, facteur « pro-bourgeoisement » et déstabilisateur intervenant dans la vasculogénèse et la première étape de l'angiogénèse et de Ang-2, facteur de stabilisation de la paroi du vaisseau intervenant dans la dernière étape de l'angiogénèse, sont toutes les deux augmentées à 12 mois chez les rats OR, que ce soit par rapport aux mêmes rats OR à 4 mois, ou aux rats OP à 12 mois. De même que pour les facteurs VEGF-A, VEGF-D et leurs récepteurs, ce résultat montre une augmentation d'expression liée à l'âge qui n'est pas observée chez les rats OP souffrant d'ICFep. (Figure 71)

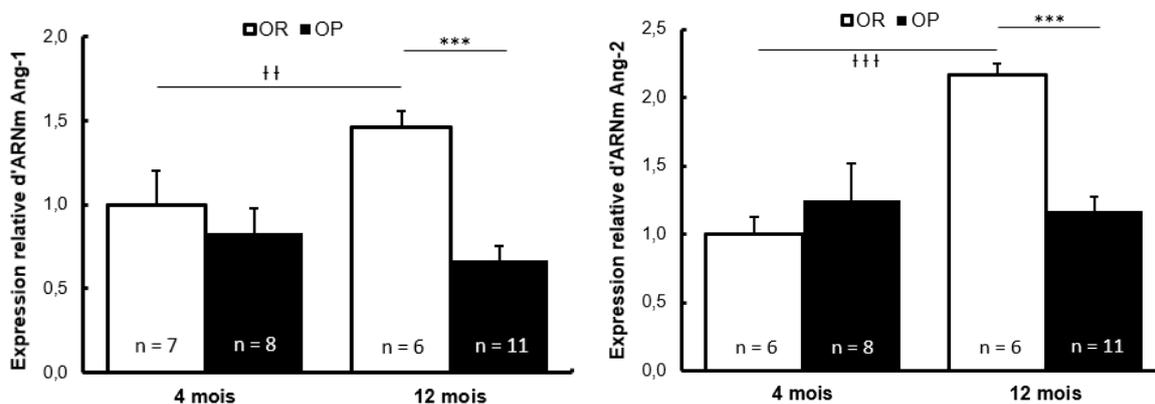


Figure 71 : Expression relative des gènes codant pour les protéines Ang-1 et Ang-2 chez les rats OP et OR à 4 et 12 mois. n = nombre d'individus ; les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$ pour les rats OP vs les rats OR ; †† $p < 0,01$ et ††† $p < 0,001$ pour les rats OR à 4 vs 12 mois.

On n'observe aucune différence significative concernant l'expression de leur récepteur commun : Tie-2 que ce soit entre les rats OP et OR ou entre les groupes de 4 ou 12 mois (Figure 72).

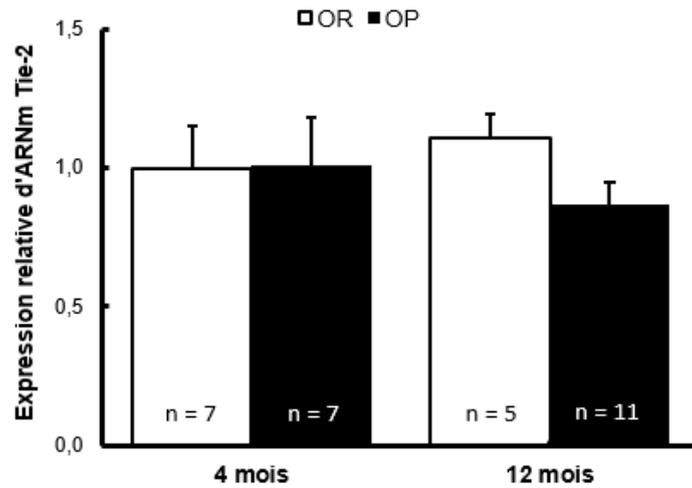


Figure 72 : Expression relative des gènes codant pour Tie2 chez les rats OP et OR à 4 et 12 mois. n = nombre d'individus ; les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM

2.4. Expression de HIF-1

HIF-1, un des facteurs stimulant l'angiogenèse, est augmenté à 12 mois chez les rats OR par rapport aux rats OP (Figure 73).

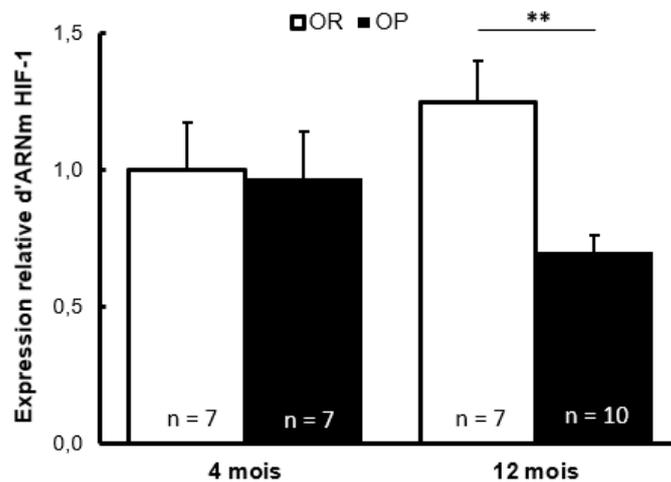


Figure 73 : Expression relative du gène codant pour HIF-1 chez les rats OP et OR à 4 et 12 mois. n = nombre d'individus ; les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; **p<0,01 pour les rats OP vs les rats OR

Discussion

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence que le réseau capillaire myocardique des rats souffrant d'ICFEP était proportionnellement réduit comparé aux animaux contrôles. En effet, leur myocarde présentait non seulement une hypertrophie des cardiomyocytes mais également une densité capillaire par cardiomyocyte réduite. La diminution de densité capillaire était déjà observée après 4 mois de régime hypercalorique et confirmée après 12 mois. A 12 mois, ce résultat était corroboré par une diminution relative de l'expression génique des facteurs angiogéniques VEGF A et D, Ang-1 et 2 et des récepteurs Flt-1, KDR et Tie-2 dans le myocarde des rats OP par rapport aux rats OR. Le facteur HIF-1 intervenant dans la signalisation hypoxique était également moins exprimé chez les rats OP à 12 mois.

L'ICFEP représente un problème majeur de santé publique. Sa prévalence est en augmentation en raison du vieillissement de la population et de la progression de l'obésité, de l'hypertension artérielle et du diabète (38% des cas d'IC en 1986 à 54% en 2002^{48,49}). Les mécanismes sous-tendant la pathogenèse de l'ICFEP restent encore largement méconnus et aucune stratégie thérapeutique ne permet de réduire la mortalité de ces patients.

Le développement d'un modèle fidèle d'ICFEP est important car l'absence de modèles précliniques, récapitulant la physiopathologie complexe de l'ICFEP telle qu'observée chez les patients, est un réel obstacle à l'avancement de la recherche et à l'innovation thérapeutique. Plusieurs modèles murins⁵⁰, félins^{51,52} et même porcins⁵³ ont été développés. Cependant la plupart de ces modèles présentent une ICFEP suite à l'intervention sur un facteur unique. L'hypertension peut être induite par un régime hypersalé⁵⁴ ou l'administration d'aldostérone⁵⁵. Une augmentation de la postcharge cardiaque gauche peut être induite par constriction de l'aorte⁵⁶. L'obésité ou le diabète peut être favorisé par une sélection monogénique (gène ZSF1⁵⁷, gène Lepr⁵⁸). Or, l'ICFEP chez l'homme se traduit par de nombreuses comorbidités d'influence polygénique et environnementales. Le modèle développé dans le laboratoire tente de se rapprocher le plus fidèlement possible à la maladie naturelle : les rats utilisés sont prédisposés à l'obésité par une sélection polygénique et non centrée sur un seul gène et une seule mutation. Ils reçoivent un régime hypercalorique riche en graisse mimant « la malbouffe » et développent une ICFEP avec l'âge dans un contexte de syndrome métabolique. Ce modèle se rapproche de l'ICFEP chez l'homme non seulement par ses comorbidités mais aussi par sa physiopathologie. Les altérations cardiaques structurelles et fonctionnelles définissant l'ICFEP sont retrouvées. On observe une fonction systolique préservée mais une dysfonction diastolique, une hypertrophie cardiaque et de la fibrose périvasculaire.

Nous avons contribué à la caractérisation de ce modèle en investiguant la microcirculation du myocarde. Comme expliqué précédemment, on observe dans ce modèle une hypertrophie pariétale visible macroscopiquement à l'échocardiographie et en microscopie par une augmentation de la surface des cardiomyocytes. Nous avons émis l'hypothèse que cette hypertrophie cardiaque pouvait entraîner une « ischémie relative », résultat d'une augmentation de la masse de tissu disproportionnée par rapport à la microcirculation. Dans l'hypertrophie physiologique que ce soit pendant le croissance, la gestation ou par l'entraînement (hypertrophie stimulée par l'exercice), le réseau vasculaire s'adapte afin de perfuser correctement le tissu cardiaque et maintenir un équilibre entre les besoins et les apports en oxygène^{39,59}. Cet équilibre est également observé lors d'une hypertrophie « adaptative » observée au stade initial d'une pathologie (surcharge en pression et/ou en volume, infarctus,...). Par contre, si le stress pathologique ne s'arrête pas ou est trop intense, on observe une hypertrophie pathologique non adaptée pouvant mener à la décompensation cardiaque^{39,59-62}. Plusieurs mécanismes tels que réduction de la densité capillaire, apoptose, stress oxydatif, processus

inflammatoire et surcharge en calcium sont impliqués dans l'hypertrophie pathologique. Nous avons montré que les rats atteints d'ICFEP avaient une hypertrophie pathologique c'est-à-dire une hypertrophie non compensée par une augmentation de capillarité mais au contraire associée à une raréfaction des capillaires. Cette hypertrophie était aussi accompagnée d'apoptose et de fibrose périvasculaire. De plus, nous avons montré que la diminution de la densité capillaire était déjà présente après 4 mois de régime, suggérant que l'ischémie relative participe à la pathogenèse de la maladie.

Pour quantifier la capillarité myocardique, nous avons utilisé une méthode immunohistochimique avec comme marqueur endothélial le CD-31. La protéine CD-31, ou « platelet/endothelial cell adhesion molecule -1 » (PECAM-1), est une molécule intervenant dans l'adhésion cellulaire au niveau des parois endothéliales. Elle est fortement exprimée au niveau de la membrane des cellules endothéliales, et dans une moindre mesure des cellules hématopoïétiques (plaquettes, monocytes, neutrophiles et cellules T)⁶³. Elle est donc relativement spécifique des cellules endothéliales et considérée comme un des marqueurs de choix⁶³⁻⁶⁶.

Un comptage manuel du nombre de capillaires et de cardiomyocytes a été réalisé. Nous avons choisi d'exclure les vaisseaux de taille supérieure à 10 μ m afin de ne pas prendre en compte artères, artérioles, veines et veinules en nous basant sur la taille moyenne d'un capillaire de rat qui est de 5 μ m⁶⁷. Nous n'avons donc pris en compte que les vaisseaux participant aux échanges. Compte tenu des variations de densité cellulaire entre les différents champs ou lames, nous avons décidé de calculer le nombre de capillaires par cardiomyocyte afin de normaliser la densité capillaire par rapport à la densité en cardiomyocytes au sein du myocarde d'un même individu. La reproductibilité de la méthode utilisée était satisfaisante (<10%).

Pour étudier le mécanisme d'angiogenèse, nous avons choisi de quantifier l'expression génique de facteurs pro-angiogéniques et de leurs récepteurs par RT-qPCR. Le choix des gènes étudiés s'est basé sur la cascade de médiateurs et récepteurs intervenant dans le processus d'angiogenèse présenté dans l'introduction. La famille VEGF participe à la vasculogenèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. Elle comprend chez l'homme plusieurs membres (VEGF-A, -B, -C, -D et PlGF), tandis que VEGF-E est d'origine virale et VEGF-F est retrouvé dans le venin de serpent. Le récepteur VEGFR2 principalement activé par VEGF-A et D induit l'angiogenèse par augmentation de la perméabilité vasculaire, et de la prolifération, survie et migration des cellules endothéliales. Le récepteur VEGFR1 liant VEGF-A et -B participe surtout à la migration cellulaire, d'autres auteurs le considère comme un récepteur leurre, induisant une faible signalisation intracellulaire. Le récepteur VEGFR3, liant VEGF-C et D est surtout responsable de la lymphangiogenèse. VEGF-A comprend plusieurs isoformes de tailles différentes produits par épissage alternatif d'un même gène⁶⁸. Dans notre étude, nous avons sélectionné des amorces localisées à cheval entre le premier et deuxième exon, les différentes isoformes du VEGF-A ont toutes comme bases commune les exons 1 à 5⁶⁹ nous avons donc amplifié l'ensemble des isoformes. Nous avons choisi d'étudier VEGF-A et -D car ce sont 2 agonistes de VEGFR2 dont l'activation/signalisation mène à l'angiogenèse.

Nous avons montré à 12 mois que les facteurs pro-angiogéniques VEGF-A, -D et Ang-2 étaient plus exprimés dans le myocarde des rats contrôles par rapport aux rats souffrant d'ICFEP tout comme les 2 récepteurs (flt-1 et KDR) du VEGF et Ang-1 qui participe à la stabilisation des parois vasculaires. Une modification d'expression génique ne permet cependant pas de conclure à une modification d'activité de la protéine associée. En effet, l'activité dépend de la production de la protéine mature (transcription, traduction, modifications post-traductionnelles), de son « trafficking » intracellulaire, de son excrétion s'il s'agit d'une protéine extracellulaire, de sa stabilité, de l'interaction avec d'autres

substances présentes dans son environnement, de l'interaction avec son récepteur et de la capacité de la cellule à répondre (signalisation intracellulaire, ...).

Le modèle développé avait pour objectif d'améliorer la compréhension de l'ICFep chez l'homme. Cette maladie se caractérise par un épaissement du myocarde, une dysfonction diastolique, de la fibrose, menant à une décompensation cardiaque. En médecine vétérinaire, une des maladies cardiaques les plus fréquentes est la cardiomyopathie hypertrophique (CMH) principalement observée chez le chat. La CMH peut être primaire (cause génétique ou inconnue) ou secondaire (cause métabolique ou surcharge hémodynamique). Chez le chat, la CMH représente 60% des pathologies cardiaques et touche près de 15% de la population féline de tout âge⁷⁰. La classification de l'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) décrit 4 stades de sévérités différentes. Au stade B1, le chat est asymptomatique et l'oreillette gauche n'est pas dilatée. Au stade B2, le chat est asymptomatique mais l'oreillette gauche est dilatée. Le stade C rassemble les chats symptomatiques, et au stade D, la décompensation cardiaque est réfractaire au traitement conventionnel. Le pronostic dépend du stade. Au stade B1, beaucoup de chats restent symptomatiques de longues années voire toute leur vie cependant, moins de 10% des chats décèdent dans l'année, 25% dans les 5 ans et 25% dans les 10 ans⁷¹. La survie est nettement plus courte chez les chats symptomatiques.

De manière similaire à l'ICFep chez l'homme, il n'y a à ce jour aucun traitement permettant de ralentir la maladie, d'améliorer la survie. Des études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité des bêta-bloquants⁷², des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine^{73,74} ou encore de la spironolactone⁷⁵ mais n'ont pas montré d'effet significatif sur l'évolution de la maladie chez les chats asymptomatiques, tandis que le pimobendan n'a pas prouvé son efficacité chez les chats symptomatiques au stade C, et serait même à éviter sur les formes obstructives^{70,76}. L'unique recommandation au stade B2 est un traitement thromboprophylaxique lorsque le risque de thromboembolie est élevé. Au stade C avec apparition de la décompensation cardiaque congestive, un traitement diurétique avec du furosémide est préconisée⁷⁰.

La CMH est également décrite en médecine humaine, cependant elle correspond uniquement à ce qu'on qualifie de CMH primaire, le diagnostic reposant sur l'identification d'une mutation en général d'un gène codant pour une protéine myofibrillaire⁷⁷. Chez le chat, certaines mutations ont été identifiées chez le Ragdoll et le Maine Coon^{78,79}. Cependant dans la grande majorité des cas de CMH primaire, l'origine génétique n'est pas reconnue et les CMH secondaires sont associées à des causes métaboliques telles que l'hyperthyroïdie ou l'acromégalie ou hémodynamiques comme l'hypertension systémique⁷⁰.

La CMH féline se rapproche de l'ICFep qui n'est pas décrite en médecine vétérinaire. Du point de vue de l'étiopathogénie, la prévalence de la maladie augmente avec l'âge⁸⁰. Chez le chat, le lien entre obésité ou diabète et CMH n'est pas encore très bien compris. Cependant, une étude montre que chez le chat, être en surpoids augmente le risque d'être atteint de CMH de presque quatre fois⁸⁰. Une autre étude montre que le diabète augmente le risque de décompensation cardiaque de dix fois⁸¹.

La pathophysiologie de la CMH féline ressemble à l'ICFep chez l'homme. Le diagnostic clinique de la CMH est basé sur l'hypertrophie des parois ventriculaires expliquant la dysfonction diastolique avec une fonction systolique préservée au moins dans les premiers stades de la maladie. La dysfonction diastolique entraîne une augmentation de la pression télédiastolique du ventricule gauche puis une dilatation de l'oreillette gauche, une augmentation de la pression veineuse pulmonaire entraînant un œdème pulmonaire et/ou de l'effusion pleurale.

L'histopathologie révèle des altérations assez similaires à celles observées dans l'ICFep et dans le modèle étudié. Une augmentation du poids du cœur et de l'épaisseur des parois du ventricule gauche est présente⁷⁰. La fibrose interstitielle et parfois réparatrice participe à l'altération de la fonction diastolique⁸²⁻⁸⁴. Un processus inflammatoire avec une prédominance de macrophages a été mis en évidence⁸⁵. Des signes d'ischémie et une diminution de la densité microvasculaire ont été observés⁸⁶.

Conclusion

Nos études ont mis en évidence une réduction de la densité capillaire dans le myocarde des rats atteints d'ICFep ainsi qu'une diminution de l'expression génique de facteurs intervenant dans les mécanismes d'angiogenèses permettant l'adaptation du réseau vasculaire à la croissance du tissu cardiaque. Cette réduction de la capillarité est précoce dès 4 mois chez les rats atteints, et pourrait participer à la pathogénie de la maladie. En effet, un tissu dont la perfusion est insuffisante va être en hypoxie, ce qui va entraîner de la mort cellulaire, de la fibrose et participer à l'aggravation de la dysfonction diastolique du cœur. On entre alors dans un cercle vicieux, c'est pourquoi il est important de comprendre les différents facteurs aggravant la maladie.

Le modèle développé par le laboratoire possède des caractéristiques qui miment relativement bien la maladie chez l'homme avec le développement d'une ICFep secondaire à un syndrome métabolique dont la prédisposition est polygénique. Le modèle peut donc être exploité afin de mieux comprendre la maladie et permettre l'innovation thérapeutique.

La revue de la littérature montre que les deux pathologies humaines (ICFep) et félines (CMH) sont assez similaires du point de vue comorbidités, physiopathologie et un panel de traitements limité. On peut donc se demander si le modèle murin développé avec pour objectif de mieux comprendre l'ICFep humaine et permettre le développement d'une thérapie pourrait également être utilisé pour la recherche en médecine vétérinaire.

Bibliographie

- (1) Hubesch, G.; Hanthazi, A.; Acheampong, A.; Chomette, L.; Lasolle, H.; Hupkens, E.; Jespers, P.; Vegh, G.; Wembonyama, C. W. M.; Verhoeven, C.; Dewachter, C.; Vachieri, J.-L.; Entee, K. M.; Dewachter, L. A Preclinical Rat Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction With Multiple Comorbidities. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 809885. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.809885>.
- (2) Louis, J.-S. Développements En IRM Quantitative de Perfusion Pour Le Diagnostic de Fibrose Myocardique, 2020.
- (3) Vascularisation et Innervation Du Coeur. Dr Bensalem.Pdf. <https://fmedecine.univ-setif.dz/Cours/Vascularisation%20et%20innervation%20du%20coeur.%20Dr%20Bensalem.pdf> (accessed 2022-10-17).
- (4) Goodwill, A. G.; Dick, G. M.; Kiel, A. M.; Tune, J. D. Regulation of Coronary Blood Flow. *Compr. Physiol.* **2017**, *7* (2), 321–382. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160016>.
- (5) Andrea. *Le tissu du myocarde, le tissu musculaire cardiaque*. NHA Naturologique. <https://naturologique.fr/le-tissu-du-myocarde/> (accessed 2022-10-17).
- (6) Ju, B.; pfrench. Cardiomyogenesis. 2022. <https://ecampusontario.pressbooks.pub/healthdiseasetopics/chapter/1-1-cardiomyogenesis/>
- (7) Sarcomère. *Wikipédia*; 2021. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Sarcom%C3%A8re>
- (8) biobenhama. *Vaisseaux sanguins*. La bio dans tous ses états. <https://biobenhama.home.blog/2020/05/02/vaisseaux-sanguins/> (accessed 2022-10-18).
- (9) *Cours - Pharmacologie - Les catécholamines*. Infirmiers.com. <https://www.infirmiers.com/etudiants/cours-et-tests/cours-pharmacologie-les-catecholamines> (accessed 2022-12-13).
- (10) Harrigan, D.; Verville-Fiset, J. Chapitre 2 – La Physiologie Cardiovasculaire. 2022. <https://ecampusontario.pressbooks.pub/tr1annee/chapter/chapitre-3/>
- (11) Walter F. Boron & Emile L. Boulpaep. *Medical Physiology, Updated Edition*; Elsevier Saunders, 2012.
- (12) Kathleen McEntee. Partim Physiologie-Quadrisemestre 2-VETEG2209, 2022.
- (13) Guyton & Hall. *Textbook of Medical Physiology*, 9th Edition. 1995
- (14) *La relation pression-volume – Echocardioblog*. <https://echocardioblog.com/2016/07/la-relation-pression-volume/> (accessed 2022-11-14).
- (15) *CV Physiology | Cardiac Afterload*. <https://cvphysiology.com/Cardiac%20Function/CF008> (accessed 2022-12-23).
- (16) Tidholm, A.; Jönsson, L. Histologic Characterization of Canine Dilated Cardiomyopathy. *Vet. Pathol.* **2005**, *42* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1354/vp.42-1-1>.
- (17) Liu, X.; Kim, C. N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for DATP and Cytochrome c. *Cell* **1996**, *86* (1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9).
- (18) Bertheloot, D.; Latz, E.; Franklin, B. S. Necroptosis, Pyroptosis and Apoptosis: An Intricate Game of Cell Death. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18* (5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>.
- (19) Wencker, D.; Chandra, M.; Nguyen, K.; Miao, W.; Garantziotis, S.; Factor, S. M.; Shirani, J.; Armstrong, R. C.; Kitsis, R. N. A Mechanistic Role for Cardiac Myocyte Apoptosis in Heart Failure. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111* (10), 1497–1504. <https://doi.org/10.1172/JCI200317664>.
- (20) Frangogiannis, N. G. Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circ. Res.* **2012**, *110* (1), 159–173. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243162>.
- (21) *La fibrose cardiaque | Elsevier Enhanced Reader*. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30460-1](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30460-1). 2017

- (22) Shimizu, I.; Minamino, T. Physiological and Pathological Cardiac Hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *97*, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.06.001>.
- (23) Gaasch, W. H.; Aurigemma, G. P. CMR Imaging of Extracellular Volume and Myocardial Strain in Hypertensive Heart Disease*. *JACC Cardiovasc. Imaging* **2015**, *8* (2), 181–183. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2014.12.002>.
- (24) Kitz, S.; Fonfara, S.; Hahn, S.; Hetzel, U.; Kipar, A. Feline Hypertrophic Cardiomyopathy: The Consequence of Cardiomyocyte-Initiated and Macrophage-Driven Remodeling Processes? *Vet. Pathol.* **2019**, *56* (4), 565–575. <https://doi.org/10.1177/0300985819837717>.
- (25) Cardiac Troponin-I Concentration, Myocardial Arteriosclerosis, and Fibrosis in Dogs with Congestive Heart Failure because of Myxomatous Mitral Valve Disease - Falk - 2013 - Journal of Veterinary Internal Medicine - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12075> (accessed 2023-04-25).
- (26) Falk, T.; Jönsson, L.; Olsen, L. H.; Tarnow, I.; Pedersen, H. D. Associations between Cardiac Pathology and Clinical, Echocardiographic and Electrocardiographic Findings in Dogs with Chronic Congestive Heart Failure. *Vet. J. Lond. Engl.* **1997** **2010**, *185* (1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.016>.
- (27) Prabhu, S. D.; Frangogiannis, N. G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ. Res.* **2016**, *119* (1), 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>.
- (28) Fontaine, M. Etude de la communication entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires via le transfert de microARN. 2017.
- (29) Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* **1996**, *86* (3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7).
- (30) Bautch, V. L.; Caron, K. M. Blood and Lymphatic Vessel Formation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7* (3), a008268. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008268>.
- (31) Warren, C. M.; Iruela-Arispe, M. L. Signaling Circuitry in Vascular Morphogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* **2010**, *17* (3), 213–218. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833865d1>.
- (32) Professors Sir George Alberti and Paul Zimmet. The IDF Consensus Worldwide Definition of the METABOLIC SYNDROME, 2006.
- (33) *Insuffisance cardiaque*. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-cardiovasculaires-et-accident-vasculaire-cerebral/insuffisance-cardiaque> (accessed 2022-11-29).
- (34) V, A. *L'insuffisance cardiaque*. Ligue Cardiologique Belge. <https://liguecardiologia.be/linsuffisance-cardiaque/> (accessed 2022-11-29).
- (35) Andersson, C.; Vasan, R. S. Epidemiology of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Heart Fail. Clin.* **2014**, *10* (3), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2014.04.003>.
- (36) Lam, C. S. P.; Roger, V. L.; Rodeheffer, R. J.; Borlaug, B. A.; Enders, F. T.; Redfield, M. M. Pulmonary Hypertension in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Community-Based Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, *53* (13), 1119–1126. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.11.051>.
- (37) Aline Schläpfer-Pessina Sebastian Carballo Arnaud Perrier Nicolas Garin. Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée : le traitement améliore-t-il le pronostic ? *Revue Medicale Suisse*. 2015.
- (38) Pieske, B.; Tschöpe, C.; de Boer, R. A.; Fraser, A. G.; Anker, S. D.; Donal, E.; Edelmann, F.; Fu, M.; Guazzi, M.; Lam, C. S. P.; Lancellotti, P.; Melenovsky, V.; Morris, D. A.; Nagel, E.; Pieske-Kraigher, E.; Ponikowski, P.; Solomon, S. D.; Vasan, R. S.; Rutten, F. H.; Voors, A. A.; Ruschitzka, F.; Paulus, W. J.; Seferovic, P.; Filippatos, G. How to Diagnose Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: The HFA-PEFF Diagnostic Algorithm: A Consensus Recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **2019**, *40* (40), 3297–3317. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz641>.

- (39) Anversa, P.; Capasso, J. M.; Ricci, R.; Sonnenblick, E. H.; Olivetti, G. Morphometric Analysis of Coronary Capillaries during Physiologic Myocardial Growth and Induced Cardiac Hypertrophy: A Review. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* **1989**, *8* (4), 353–363.
- (40) Anversa, P.; Levicky, V.; Beghi, C.; McDonald, S. L.; Kikkawa, Y. Morphometry of Exercise-Induced Right Ventricular Hypertrophy in the Rat. *Circ. Res.* **1983**, *52* (1), 57–64. <https://doi.org/10.1161/01.res.52.1.57>.
- (41) Gogiraju, R.; Bochenek, M. L.; Schäfer, K. Angiogenic Endothelial Cell Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *6*, 20. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00020>.
- (42) Anversa, P.; Capasso, J. M. Loss of Intermediate-Sized Coronary Arteries and Capillary Proliferation after Left Ventricular Failure in Rats. *Am. J. Physiol.* **1991**, *260* (5 Pt 2), H1552–1560. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.5.H1552>.
- (43) Ventéo, L.; Sutter, A. Les Différents Systèmes d’amplification En Immunohistochimie : AVANTAGES, INCONVENIENTS ET OPTIMISATION. *Ref Fr Histotechnol* **2011**, *24*, 129–142.
- (44) *Vég-Di@g - PCR*. <http://ephytia.inra.fr/fr/C/23575/Veg-Di-g-PCR> (accessed 2022-12-28).
- (45) *One-step RT-qPCR kits*. <https://www.takarabio.com/learning-centers/real-time-pcr/overview/one-step-rt-qpcr-kits> (accessed 2022-12-28).
- (46) *SYBR Green for qPCR | Bio-Rad*. <https://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html> (accessed 2022-12-28).
- (47) Quéméneur, M. Les Processus Biogéochimiques Impliqués Dans La Mobilité de l’arsenic : Recherche de Bioindicateurs, 2008.
- (48) *Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21160056/> (accessed 2023-07-28).
- (49) Owan, T. E.; Hodge, D. O.; Herges, R. M.; Jacobsen, S. J.; Roger, V. L.; Redfield, M. M. Trends in Prevalence and Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355* (3), 251–259. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052256>.
- (50) *Effects of different exercise modalities on cardiac dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction - PMC*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8120378/> (accessed 2023-06-01).
- (51) Wallner, M.; Eaton, D. M.; Berretta, R. M.; Borghetti, G.; Wu, J.; Baker, S. T.; Feldsott, E. A.; Sharp, T. E.; Mohsin, S.; Oyama, M. A.; von Lewinski, D.; Post, H.; Wolfson, M. R.; Houser, S. R. A Feline HFpEF Model with Pulmonary Hypertension and Compromised Pulmonary Function. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 16587. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15851-2>.
- (52) Eaton, D. M.; Berretta, R. M.; Lynch, J. E.; Travers, J. G.; Pfeiffer, R. D.; Hulke, M. L.; Zhao, H.; Hobby, A. R. H.; Schena, G.; Johnson, J. P.; Wallner, M.; Lau, E.; Lam, M. P. Y.; Woulfe, K. C.; Tucker, N. R.; McKinsey, T. A.; Wolfson, M. R.; Houser, S. R. Sex-Specific Responses to Slow Progressive Pressure Overload in a Large Animal Model of HFpEF. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **2022**, *323* (4), H797–H817. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00374.2022>.
- (53) Charles, C. J.; Lee, P.; Li, R. R.; Yeung, T.; Ibrahim Mazlan, S. M.; Tay, Z. W.; Abdurrachim, D.; Teo, X. Q.; Wang, W.-H.; de Kleijn, D. P. V.; Cozzone, P. J.; Lam, C. S. P.; Richards, A. M. A Porcine Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Magnetic Resonance Imaging and Metabolic Energetics. *ESC Heart Fail.* **2020**, *7* (1), 92–102. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12536>.
- (54) Bowen, T. S.; Rolim, N. P. L.; Fischer, T.; Baekkerud, F. H.; Medeiros, A.; Werner, S.; Brønstad, E.; Rognmo, O.; Mangner, N.; Linke, A.; Schuler, G.; Silva, G. J. J.; Wisløff, U.; Adams, V.; Optimex Study Group. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction Induces Molecular, Mitochondrial, Histological, and Functional Alterations in Rat Respiratory and Limb Skeletal Muscle. *Eur. J. Heart Fail.* **2015**, *17* (3), 263–272. <https://doi.org/10.1002/ejhf.239>.
- (55) Tanaka, K.; Wilson, R. M.; Essick, E. E.; Duffen, J. L.; Scherer, P. E.; Ouchi, N.; Sam, F. Effects of Adiponectin on Calcium-Handling Proteins in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Circ. Heart Fail.* **2014**, *7* (6), 976–985. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001279>.

- (56) Ma, J.; Luo, T.; Zeng, Z.; Fu, H.; Asano, Y.; Liao, Y.; Minamino, T.; Kitakaze, M. Histone Deacetylase Inhibitor Phenylbutyrate Exaggerates Heart Failure in Pressure Overloaded Mice Independently of HDAC Inhibition. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34036. <https://doi.org/10.1038/srep34036>.
- (57) Schauer, A.; Draskowski, R.; Jannasch, A.; Kirchhoff, V.; Goto, K.; Männel, A.; Barthel, P.; Augstein, A.; Winzer, E.; Tugtekin, M.; Labeit, S.; Linke, A.; Adams, V. ZSF1 Rat as Animal Model for HFpEF: Development of Reduced Diastolic Function and Skeletal Muscle Dysfunction. *ESC Heart Fail.* **2020**, *7* (5), 2123–2134. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12915>.
- (58) Mori, J.; Patel, V. B.; Abo Alrob, O.; Basu, R.; Altamimi, T.; Desaulniers, J.; Wagg, C. S.; Kassiri, Z.; Lopaschuk, G. D.; Oudit, G. Y. Angiotensin 1-7 Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy and Diastolic Dysfunction in Db/Db Mice by Reducing Lipotoxicity and Inflammation. *Circ. Heart Fail.* **2014**, *7* (2), 327–339. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000672>.
- (59) Gibb, A. A.; Epstein, P. N.; Uchida, S.; Zheng, Y.; McNally, L. A.; Obal, D.; Katragadda, K.; Trainor, P.; Conklin, D. J.; Brittan, K. R.; Tseng, M. T.; Wang, J.; Jones, S. P.; Bhatnagar, A.; Hill, B. G. Exercise-Induced Changes in Glucose Metabolism Promote Physiological Cardiac Growth. *Circulation* **2017**, *136* (22), 2144–2157. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028274>.
- (60) Oka, T.; Akazawa, H.; Naito, A. T.; Komuro, I. Angiogenesis and Cardiac Hypertrophy: Maintenance of Cardiac Function and Causative Roles in Heart Failure. *Circ. Res.* **2014**, *114* (3), 565–571. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300507>.
- (61) Gogiraju, R.; Bochenek, M. L.; Schäfer, K. Angiogenic Endothelial Cell Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *6*, 20. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00020>.
- (62) Oldfield, C. J.; Duhamel, T. A.; Dhalla, N. S. Mechanisms for the Transition from Physiological to Pathological Cardiac Hypertrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2020**, *98* (2), 74–84. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0566>.
- (63) Lertkiatmongkol, P.; Liao, D.; Mei, H.; Hu, Y.; Newman, P. J. Endothelial Functions of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31). *Curr. Opin. Hematol.* **2016**, *23* (3), 253–259. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000239>.
- (64) Patel, S. D.; Peterson, A.; Bartczak, A.; Lee, S.; Chojnowski, S.; Gajewski, P.; Loukas, M. Primary Cardiac Angiosarcoma - a Review. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2014**, *20*, 103–109. <https://doi.org/10.12659/MSM.889875>.
- (65) Ramos-Vara, J. A.; Miller, M. A.; Dusold, D. M. Immunohistochemical Expression of CD31 (PECAM-1) in Nonendothelial Tumors of Dogs. *Vet. Pathol.* **2018**, *55* (3), 402–408. <https://doi.org/10.1177/0300985817751217>.
- (66) Jiang, L.; Lin, L.; Li, R.; Yuan, C.; Xu, M.; Huang, J. H.; Huang, M. Dimer Conformation of Soluble PECAM-1, an Endothelial Marker. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *77*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.06.001>.
- (67) Henquell, L.; LaCelle, P. L.; Honig, C. R. Capillary Diameter in Rat Heart in Situ: Relation to Erythrocyte Deformability, O₂ Transport, and Transmural O₂ Gradients. *Microvasc. Res.* **1976**, *12* (3), 259–274. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(76\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0026-2862(76)90025-X).
- (68) Peach, C. J.; Mignone, V. W.; Arruda, M. A.; Alcobia, D. C.; Hill, S. J.; Kilpatrick, L. E.; Woolard, J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (4), 1264. <https://doi.org/10.3390/ijms19041264>.
- (69) Mamer, S.; Wittenkeller, A.; Imoukhuede, P. VEGF-A Splice Variants Bind VEGFRs with Differential Affinities. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14413. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71484-y>.
- (70) Luis Fuentes, V.; Abbott, J.; Chetboul, V.; Côté, E.; Fox, P. R.; Häggström, J.; Kittleson, M. D.; Schober, K.; Stern, J. A. ACVIM Consensus Statement Guidelines for the Classification, Diagnosis, and Management of Cardiomyopathies in Cats. *J. Vet. Intern. Med.* **2020**, *34* (3), 1062–1077. <https://doi.org/10.1111/jvim.15745>.
- (71) *International collaborative study to assess cardiovascular risk and evaluate long-term health in cats with preclinical hypertrophic cardiomyopathy and apparently healthy cats: The REVEAL Study - Fox - 2018 - Journal of Veterinary Internal Medicine - Wiley Online Library.* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvim.15122> (accessed 2023-07-06).

- (72) Coleman, A. E.; DeFrancesco, T. C.; Griffiths, E. H.; Lascelles, B. D. X.; Kleisch, D. J.; Atkins, C. E.; Keene, B. W. Atenolol in Cats with Subclinical Hypertrophic Cardiomyopathy: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial of Effect on Quality of Life, Activity, and Cardiac Biomarkers. *J. Vet. Cardiol. Off. J. Eur. Soc. Vet. Cardiol.* **2020**, *30*, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2020.06.002>.
- (73) MacDonald, K. A.; Kittleson, M. D.; Larson, R. F.; Kass, P.; Klose, T.; Wisner, E. R. The Effect of Ramipril on Left Ventricular Mass, Myocardial Fibrosis, Diastolic Function, and Plasma Neurohormones in Maine Coon Cats with Familial Hypertrophic Cardiomyopathy without Heart Failure. *J. Vet. Intern. Med.* **2006**, *20* (5), 1093–1105. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[1093:teorol\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[1093:teorol]2.0.co;2).
- (74) *Evaluation of benazepril in cats with heart disease in a prospective, randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31560137/> (accessed 2023-07-06).
- (75) MacDonald, K. A.; Kittleson, M. D.; Kass, P. H.; White, S. D. Effect of Spironolactone on Diastolic Function and Left Ventricular Mass in Maine Coon Cats with Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* **2008**, *22* (2), 335–341. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0049.x>.
- (76) Schober, K. E.; Rush, J. E.; Luis Fuentes, V.; Glaus, T.; Summerfield, N. J.; Wright, K.; Lehmkuhl, L.; Wess, G.; Sayer, M. P.; Loureiro, J.; MacGregor, J.; Mohren, N. Effects of Pimobendan in Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy and Recent Congestive Heart Failure: Results of a Prospective, Double-Blind, Randomized, Nonpivotal, Exploratory Field Study. *J. Vet. Intern. Med.* **2021**, *35* (2), 789–800. <https://doi.org/10.1111/jvim.16054>.
- (77) *Diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy - PMC.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4676455/> (accessed 2023-07-28).
- (78) Granström, S.; Godiksen, M. T. N.; Christiansen, M.; Pipper, C. B.; Martinussen, T.; Møgelvang, R.; Sjøgaard, P.; Willesen, J. L.; Koch, J. Genotype-Phenotype Correlation between the Cardiac Myosin Binding Protein C Mutation A31P and Hypertrophic Cardiomyopathy in a Cohort of Maine Coon Cats: A Longitudinal Study. *J. Vet. Cardiol. Off. J. Eur. Soc. Vet. Cardiol.* **2015**, *17 Suppl 1*, S268-281. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2015.10.005>.
- (79) Meurs, K. M.; Norgard, M. M.; Ederer, M. M.; Hendrix, K. P.; Kittleson, M. D. A Substitution Mutation in the Myosin Binding Protein C Gene in Ragdoll Hypertrophic Cardiomyopathy. *Genomics* **2007**, *90* (2), 261–264. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.04.007>.
- (80) Payne, J. R.; Brodbelt, D. C.; Luis Fuentes, V. Cardiomyopathy Prevalence in 780 Apparently Healthy Cats in Rehoming Centres (the CatScan Study). *J. Vet. Cardiol. Off. J. Eur. Soc. Vet. Cardiol.* **2015**, *17 Suppl 1*, S244-257. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2015.03.008>.
- (81) Little, C. J. L.; Gettinby, G. Heart Failure Is Common in Diabetic Cats: Findings from a Retrospective Case-Controlled Study in First-Opinion Practice. *J. Small Anim. Pract.* **2008**, *49* (1), 17–25. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00466.x>.
- (82) Mohammed, S. F.; Hussain, S.; Mirzoyev, S. A.; Edwards, W. D.; Maleszewski, J. J.; Redfield, M. M. Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Circulation* **2015**, *131* (6), 550–559. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009625>.
- (83) Westermann, D.; Lindner, D.; Kasner, M.; Zietsch, C.; Savvatis, K.; Escher, F.; von Schlippenbach, J.; Skurk, C.; Steendijk, P.; Riad, A.; Poller, W.; Schultheiss, H.-P.; Tschöpe, C. Cardiac Inflammation Contributes to Changes in the Extracellular Matrix in Patients with Heart Failure and Normal Ejection Fraction. *Circ. Heart Fail.* **2011**, *4* (1), 44–52. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.931451>.
- (84) Fox, P. R. Endomyocardial Fibrosis and Restrictive Cardiomyopathy: Pathologic and Clinical Features. *J. Vet. Cardiol. Off. J. Eur. Soc. Vet. Cardiol.* **2004**, *6* (1), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S1760-2734\(06\)70061-3](https://doi.org/10.1016/S1760-2734(06)70061-3).
- (85) Aupperle, H.; Baldauf, K.; März, I. An Immunohistochemical Study of Feline Myocardial Fibrosis. *J. Comp. Pathol.* **2011**, *145* (2–3), 158–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.12.003>.

- (86) Rodríguez, J. M. M.; Fonfara, S.; Hetzel, U.; Kipar, A. Feline Hypertrophic Cardiomyopathy: Reduced Microvascular Density and Involvement of CD34+ Interstitial Cells. *Vet. Pathol.* **2022**, *59* (2), 269–283. <https://doi.org/10.1177/03009858211062631>.

Annexe 1 : Comptage en double aveugle des cardiomyocytes et capillaires

Op1	OP2	Mean	Sd	CV
Capillaires/Cardiomyocytes				
1,637	1,491	1,56	0,10	6,62
1,360	1,295	1,33	0,05	3,50
1,641	1,488	1,56	0,11	6,89
1,280	1,390	1,34	0,08	5,82
1,749	1,580	1,66	0,12	7,16
1,532	1,504	1,52	0,02	1,32
1,709	1,704	1,71	0,00	0,18
1,640	1,608	1,62	0,02	1,38
1,537	1,699	1,62	0,11	7,10
1,565	1,529	1,547	0,026	1,65
0,16	0,14	0,13		
10,0	8,9	8,7		

Zones		Op1	OP2	Mean	Sd	CV
		Capillaires				
C68	E1	316	325	321	6,4	1,99
	E2	268	290	279	15,6	5,58
	E3	251	250	251	0,7	0,28
	E4	233	253	243	14,1	5,82
C79	E1	327	335	331	5,7	1,71
	E2	331	364	348	23,3	6,71
	E3	176	196	186	14,1	7,60
	E4	310	304	307	4,2	1,38
	E5	209	209	209	0,0	0,00
Tous	Mean	269	281	275	8,2	3,00
	SD	56	58	56		
	CV	20,8	20,5	20,5		
		Cardiomyocytes				
		193	218	206	17,7	8,60
		197	224	211	19,1	9,07
		153	168	161	10,6	6,61
		182	182	182	0,0	0,00
		187	212	200	17,7	8,86
		216	242	229	18,4	8,03
		103	115	109	8,5	7,78
		189	189	189	0,0	0,00
		136	123	130	9,2	7,10
	Mean	173	186	179	9,2	5,12
		35	44	39		
		20,5	23,8	22,0		

CV = (écart-type / moyenne)*100

Annexe 2 : Protocole de fixation et d'inclusion des organes

- Rinçage du prélèvement à l'eau physiologique
- Fixation dans du formaldéhyde pendant 24h à température ambiante
- Déshydratation dans des bains d'alcool de titre croissant
 - 70° → 1h
 - 70° → 2h
 - 90° → 1h
 - 90° → 2h
 - 100° → 2h
 - 100° → 3h
 - 100° → 3h

- Placer les lames dans 2 bains de toluène pendant 1h chacun
- Placer les lames dans un bain de paraffine fondue
- Disposer les organes dans des moules et compléter de paraffine fondue
- Déplacer le moule sur une plaque froide
- Démoulage des organes
- Coupe au microtome de bloc de paraffine (3 µm d'épaisseur)
- Étalement des coupes
- Montage sur lames
- Séchages des lames overnight sur plaque chauffante
- Coloration de 2 lames à l'hématoxyline éosine afin de valider les coupes avant leur utilisation en histochimie

- ♦ Déparaffiner : tremper les lames pendant 10 min dans des bains de toluène
- ♦ Réhydratation des lames :
 - Premier bain d'alcool à 90° : tremper une 10^{ème} de fois les lames
 - Deuxième bain d'alcool à 70° : tremper une 10^{ème} de fois les lames
- ♦ Rinçage des lames sous l'eau courante pendant 7 min
- ♦ Plonger les lames dans un bain d'hématoxyline pendant 4 min
- ♦ Rinçage des lames sous l'eau courante pendant 7 min
- ♦ Plonger les lames dans un bain d'éosine pendant 2 min 30 sec
- ♦ Rinçage des lames dans l'eau distillée en trempant les lames une 10^{ème} de fois
- ♦ Passer les lames une 10^{ème} de fois dans un bain d'alcool à 70°
- ♦ Passer les lames une 10^{ème} de fois dans un bain d'alcool à 90°
- ♦ Passer les lames pendant 5 min dans un bain d'alcool à 100°
- ♦ Tremper les lames au moins pendant 5 min dans le xylène
- ♦ Monter les lames avec de la colle histologique

Annexe 3 : Protocole validation des amorces sur série de dilution

Pour la préparation des amorces :

- Étiqueter 2 eppendorfs du nom du gène, un reverse et un forward
- Vortexer et centrifuger les amorces
- Diluer les amorces R et F de 100 μM pour obtenir une concentration de 5 μM :
50 μL amorce + 950 μL d'eau
- Vortexer et centrifuger

Préparation des dilutions :

- Préparer un pool de cDNA de 3 échantillons de cœur de rats
- Étiqueter 7 eppendorfs de 0,2ml (1 à 7)
- Mettre 28 μL d'eau dans l'éppendorf 1 et 15 μL d'eau dans les eppendorfs 2 à 7
- Ajouter 4 μL du pool à l'éppendorf 1, vortexer et centrifuger
- Prélever 15 μL de la dilution 1 et ajouter dans la dilution 2, vortexer et centrifuger
- Prélever 15 μL de la dilution 2 et ajouter dans la dilution 3, vortexer et centrifuger
- Prélever 15 μL de la dilution 3 et ajouter dans la dilution 4, vortexer et centrifuger
- Prélever 15 μL de la dilution 4 et ajouter dans la dilution 5, vortexer et centrifuger
- Prélever 15 μL de la dilution 5 et ajouter dans la dilution 6, vortexer et centrifuger
- Prélever 15 μL de la dilution 6 et ajouter dans la dilution 7, vortexer et centrifuger

Plan de plaque :

Plaque Cœur - Test Amorces												
Gene	Couple d'amorce à tester 1			Couple d'amorce à tester 2			Couple d'amorce à tester 3			Couple d'amorce à tester 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 1			Dilution 1			Dilution 1			Dilution 1		
B	Dilution 2			Dilution 2			Dilution 2			Dilution 2		
C	Dilution 3			Dilution 3			Dilution 3			Dilution 3		
D	Dilution 4			Dilution 4			Dilution 4			Dilution 4		
E	Dilution 5			Dilution 5			Dilution 5			Dilution 5		
F	Dilution 6			Dilution 6			Dilution 6			Dilution 6		
G	Dilution 7			Dilution 7			Dilution 7			Dilution 7		
H	Ctrl Neg			Ctrl Neg			Ctrl Neg			Ctrl Neg		

Dans chaque puit :

- 12,5 μL de SybrGreen
- 2 μL d'amorce Forward
- 2 μL d'amorce Reverse
- 4,5 μL d' H_2O ARN free
- 4 μL de préparation diluée (plan de la plaque)

ETUDE DU REMODELAGE VASCULAIRE CARDIAQUE CHEZ UN MODELE MURIN D'INSUFFISANCE CARDIAQUE A FRACTION D'EJECTION PRESERVEE

Auteure : DOPPLER Mathilde

Résumé :

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFep) est un syndrome clinique fréquent et grave. L'absence de modèle préclinique, récapitulant la physiopathologie complexe de l'ICFep chez le patient humain, est un réel obstacle à l'avancement de la recherche et à l'innovation thérapeutique. Un modèle murin d'ICFep a été développé. L'objectif de cette thèse était de caractériser la microvascularisation myocardique de ce modèle. L'hypothèse de recherche est que les animaux présentent une hypertrophie pathologique du myocarde, non associée ou disproportionnée par rapport à sa capillarité. Des rats prédisposés à l'obésité (OP) étaient nourris ad libitum avec un régime riche en graisses pendant 4 ou 12 mois et comparés à des rats résistants à l'obésité (OR) nourris avec une alimentation standard. Les critères métaboliques du syndrome métabolique étaient présents dès 4 mois de régime et confirmés à 12 mois. A 12 mois, les animaux présentaient également une hypertension systémique, une hypertrophie cardiaque et une dysfonction diastolique, critères définissant l'ICFep. La densité capillaire de la paroi libre du ventricule gauche a été quantifiée par immunomarquage au CD31. Le nombre de capillaires par cardiomyocyte était significativement réduit ($p < 0,01$) chez les animaux OP dès 4 mois et confirmée après 12 mois de régime. L'expression génique relative de HIF-1, VEGF-A, VEGF-D, Ang-1 et Ang-2, les principaux médiateurs de l'angiogenèse et des deux récepteurs du VEGF (flt-1 et KDR) était diminuée à 12 mois chez les animaux OP par rapport aux rats OR. Ces résultats supportent l'hypothèse d'un dysfonctionnement des voies de l'angiogenèse et d'une réduction de la densité capillaire menant à une hypertrophie cardiaque pathologique. La précocité de la raréfaction capillaire dans ce modèle suggère qu'une ischémie relative pourrait participer à la pathogenèse et à l'évolution de ce modèle pathologique caractérisé également par de l'apoptose et de la fibrose. Ce modèle reflétant l'étiopathogénie, la physiopathologie et l'histopathologie de l'ICFep chez l'homme mais également de la CMH féline, pourrait être utilisé pour faire avancer la recherche translationnelle et l'innovation thérapeutique dans ce domaine.

Mots clés : *Cardiologie ; insuffisance cardiaque ; fraction d'éjection préservée ; densité capillaire ; angiogenèse ; modèle murin*

Summary:

Preserved Ejection Fraction Heart Failure (PEF-HF) is a common and severe clinical syndrome. The lack of a preclinical model that recapitulates the complex pathophysiology of PEF-HF in human patients is a significant barrier to the advancement of research and therapeutic innovation. A murine model of PEF-HF has been developed. The objective of this thesis was to characterize the myocardial microvascularization of this model. The research hypothesis is that the animals exhibit pathological myocardial hypertrophy, not associated with or disproportionate to its capillarity. Obesity-prone (OP) rats were fed ad libitum with a high-fat diet for 4 or 12 months and compared to obesity-resistant (OR) rats fed a standard diet. Metabolic criteria of the metabolic syndrome were present as early as 4 months of the diet and confirmed at 12 months. At 12 months, the animals also displayed systemic hypertension, cardiac hypertrophy, and diastolic dysfunction, defining the PEF-HF criteria. Capillary density of the free wall of the left ventricle was quantified using CD31 immunolabeling. The number of capillaries per cardiomyocyte was significantly reduced ($p < 0.01$) in OP animals as early as 4 months and confirmed after 12 months of the diet. The relative gene expression of HIF-1, VEGF-A, VEGF-D, Ang-1, and Ang-2, the main mediators of angiogenesis, and the two VEGF receptors (flt-1 and KDR) was decreased at 12 months in OP animals compared to OR rats. These results support the hypothesis of angiogenesis pathway dysfunction and a reduction in capillary density leading to pathological cardiac hypertrophy. The early occurrence of capillary rarefaction in this model suggests that relative ischemia could contribute to the pathogenesis and progression of this pathological model, also characterized by apoptosis and fibrosis. This model, reflecting the etiopathogenesis, pathophysiology, and histopathology of PEF-HF in humans as well as feline hypertrophic cardiomyopathy (HCM), could be used to advance translational research and therapeutic innovation in this field.

Key-words : *Cardiology; heart failure; preserved ejection fraction; capillary density; angiogenesis; murine model.*