



Université de Montréal

***Régulations homéostatiques cardiovasculaires suite à une transfusion par échange avec du sang hyperagrégant chez le rat***

Par  
Julie Vanier

Sciences biomédicales, Université de Montréal  
Faculté des Sciences de la Santé

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en Sciences biomédicales

Décembre, 2009

©, Julie Vanier, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Régulations homéostatiques cardiovasculaires suite à une transfusion par échange  
avec du sang hyperagrégeant chez le rat

présenté par :  
Julie Vanier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :  
Président rapporteur : Dr Denis Deblois  
Directeur de recherche : Dr Guy Cloutier  
Membre du jury : Dr Nicolas Noiseux

## RÉSUMÉ EN FRANÇAIS ET MOTS CLÉS

Dans le but de vérifier l'impact d'un changement soudain dans l'agrégation érythrocytaire sur certains paramètres cardiovasculaires, une transfusion par échange sanguin du tiers du volume a été effectuée avec du sang hyperagrégeant chez le rat de souche Brown Norway. La pression caudale, le volume cardiaque systolique, la fraction d'éjection, le débit cardiaque, le rythme cardiaque et la résistance périphérique à l'écoulement sanguin ont été observés non-intrusivement sur 19 jours suite à la transfusion. Les rats ont été sacrifiés plus d'un mois suivant la transfusion et une étude *ex vivo* de la réponse à deux agents dilatateurs (l'acétylcholine et le nitroprussiate de sodium) a été menée sur les artérioles mésentériques. Des variations des paramètres cardiovasculaires, soit le débit, le volume systolique et la résistance périphérique, ont été remarquées dans les trois premiers jours posttransfusion. Une résistance du muscle vasculaire lisse au monoxyde d'azote a été notée chez les rats transfusés au sang hyperagrégeant alors qu'aucune dysfonction endothéliale n'était apparente en réponse à l'acétylcholine.

Mots clés : agrégation érythrocytaire, transfusion, fonction cardiaque, fonction vasculaire, fonction endothéliale, hémorhéologie, viscosité sanguine, pression artérielle moyenne, débit cardiaque.

## RÉSUMÉ EN ANGLAIS ET MOTS CLÉS

The aim of this study was to evaluate the effects of an acute change in erythrocyte aggregation on cardiovascular parameters by exchanging one third of the blood volume with hyperaggregating blood in the Brown Norway rat model. Values of caudal pressure, systolic cardiac volume, ejection fraction, cardiac output, heart rate and peripheral resistance to blood flow were observed non-invasively over 19 days after transfusion. The rats were sacrificed after more than a month following the procedure and an *ex vivo* study in response to pharmacological agents (acetylcholine and sodium nitroprussiate) was performed on mesenteric arterioles. Variations in cardiac output, systolic volume and peripheral resistance were noted for the first three days post-transfusion. The vascular smooth muscles of rats transfused with the hyperaggregating erythrocytes seemed to have developed a resistance to nitric oxide but no endothelial dysfunction was observed in response to acetylcholine.

Key Word : erythrocyte aggregation, transfusion, cardiac function, vascular function, endothelial function, hemorheology, blood viscosity, mean arterial pressure, cardiac output.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS ET MOTS CLÉS.....	III
RÉSUMÉ EN ANGLAIS ET MOTS CLÉS .....	IV
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES GRAPHIQUES .....	X
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XII
REMERCIEMENTS .....	XV
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	17
LES FACTEURS INFLUENÇANT LA PRESSION SANGUINE .....	17
Les paramètres de la pression sanguine .....	17
Définition.....	17
Effecteurs de la pression sanguine .....	18
Facteurs influençant le débit cardiaque.....	18
Facteurs influençant la résistance périphérique .....	19
Réponse multifactorielle.....	20
L'homéostasie .....	20
Définition.....	20
Déséquilibre homéostatique.....	20
Différents systèmes homéostatiques .....	21
LE RÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DANS LA RÉGULATION DE LA PRESSION SANGUINE .....	21
A. <i>Système régulateur systémique</i> .....	21
Le système nerveux comme centre d'intégration de la pression sanguine.....	22
Rôle du système nerveux autonome .....	22
Le système cardiovasculaire comme effecteur dans la régulation de la pression sanguine .....	22
Le réflexe des barorécepteurs.....	23
Le système rénal comme effecteur dans la régulation de la pression sanguine.....	25
Le contrôle homéostatique du volume sanguin au niveau du rein.....	26
L'activité rénale sympathique.....	27
B. <i>Systèmes régulateurs locaux vasculaires</i> .....	28
Les différents types de stimuli mécaniques .....	28
L'endothélium.....	29
L'importance de l'endothélium .....	29
Les fonctions de l'endothélium .....	30
La structure de l'endothélium.....	30
La réponse vasculaire endothéliale .....	31
La collaboration entre l'endothélium et le muscle lisse.....	31
Le monoxyde d'azote .....	32
La monoxyde d'azote synthase .....	32
L'activation de la monoxyde d'azote synthase.....	33
La régulation de l'expression de la monoxyde d'azote synthase.....	35
La rétro-inhibition de la réponse endothéliale.....	36
L'endothéline-1.....	37
Le cisaillement à la paroi vasculaire comme stimulus de la cellule endothéliale.....	38

La cellule endothéliale comme capteur et centre d'intégration.....	38
Modification du phénotype vasculaire .....	39
Les adaptations vasculaires dues au flot sanguin local .....	39
NOTIONS DE BASE POUR INTERPRÉTER LE TRACÉ D'UNE COURBE DOSE-RÉPONSE .....	40
LE SANG ET SON INFLUENCE SUR LE CISAILLEMENT À LA PAROI .....	42
Le sang.....	42
La composition du sang .....	42
Le globule rouge.....	42
Les facteurs sanguins modulant la résistance périphérique.....	43
L'hémorhéologie .....	43
La résistance à l'écoulement sanguin et le cisaillement à la paroi vasculaire.....	44
L'agrégation des globules rouges et la viscosité du sang .....	44
La résistance au flot et la viscosité .....	45
LE PROJET DE RECHERCHE.....	46
Modulation de l'expression de la monoxyde d'azote synthase par l'agrégation des globules rouges .....	46
Le projet .....	48
<b>CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE .....</b>	<b>46</b>
LA TRANSFUSION.....	46
<i>RÉCOLTE DU VOLUME SANGUIN NÉCESSAIRE AU PROTOCOLE DE TRANSFUSION</i> .....	52
Détermination du volume de sang nécessaire .....	52
La collecte de sang .....	52
L'anticoagulant.....	53
Exsanguination du rat par l'aorte abdominale .....	53
Préparation de l'animal .....	53
Procédure .....	54
Précision éthique.....	54
<i>TRAITEMENT DES GLOBULES ROUGES</i> .....	55
Filtration du sang .....	55
Le Marquage en fluorescence.....	56
Séparation des phases et lavages des érythrocytes.....	56
Le marqueur fluorescent .....	56
Précaution .....	57
Le marquage en fluorescence .....	57
Le revêtement de polymères à la membrane des globules rouges .....	58
Les polymères .....	59
Effet du traitement agrégeant sur la viscosité sanguine .....	59
Précaution .....	60
Procédure .....	61
<i>PROCÉDURE DE TRANSFUSION</i> .....	61
Complications possibles.....	63
Préparation de l'animal à transfuser .....	64
Procédure chirurgicale.....	64
Exposition de la veine fémorale gauche .....	64
Isolement du vaisseau .....	65
Insertion du cathéter.....	65
Procédure sur l'artère fémorale.....	66
Transfusion .....	66
Suture des plaies .....	67
Réveil de l'animal .....	67
<i>CONTRÔLE DE LA RÉUSSITE DE LA TRANSFUSION</i> .....	67
Observation de la fluorescence dans les échantillons sanguins .....	68
SUIVI LONGITUDINAL DES VARIABLES CARDIOVASCULAIRES DES RATS TRANSFUSÉS .....	69
<i>MÉTHODOLOGIE POUR LA COLLECTE DES RÉSULTATS</i> .....	70
Préparation à la prise de données.....	71
Anesthésie de l'animal.....	71
Préparation de l'animal .....	71

Collecte des résultats .....	72
Acquisition d'images échographiques cardiaques en coupe longitudinale .....	72
Acquisition de la pression systolique sur la queue de l'animal.....	73
Analyse des résultats.....	73
Segmentation des images cardiaques .....	73
Estimation de la résistance périphérique.....	75
<b>ÉVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE DES ARTÉRIOLES MÉSENTÉRIQUES.....</b>	<b>75</b>
<b>PROCÉDURE D'ÉVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE .....</b>	<b>77</b>
Prélèvement vasculaire .....	78
Nécropsie.....	78
Dissection du vaisseau.....	79
Préparation du vaisseau .....	79
Stabilisation en milieu physiologique .....	80
Détermination de la dose de précontraction à la norépinephrine (NE) .....	80
Étude vasculaire.....	80
Étude dépendante de l'endothélium.....	81
Étude indépendante de l'endothélium.....	81
Étude contrôle dépendante de l'endothélium .....	82
Analyse des résultats.....	82
Validation statistique.....	82
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....</b>	<b>83</b>
PRÉSENTATION DES RÉSULTATS LONGITUDINAUX.....	83
<i>Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur la pression systolique de la queue.....</i>	<i>83</i>
<i>Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur le débit cardiaque.....</i>	<i>84</i>
<i>Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur le rythme cardiaque .....</i>	<i>86</i>
<i>Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur la fraction d'éjection.....</i>	<i>88</i>
<i>Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur le volume systolique .....</i>	<i>89</i>
<i>Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur la résistance périphérique.....</i>	<i>90</i>
<i>Résumé des résultats statistiques longitudinaux.....</i>	<i>91</i>
PRÉSENTATION DES RÉSULTATS DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE.....	91
<i>Étude de la relaxation dépendante de l'endothélium .....</i>	<i>92</i>
<i>Étude de la relaxation indépendante de l'endothélium.....</i>	<i>94</i>
<i>Étude contrôle de la relaxation dépendante de l'endothélium.....</i>	<i>97</i>
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>77</b>
RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE LONGITUDINALE .....	77
RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DE L'ÉVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE.....	103
SYNTHÈSE RÉCAPITULATIVE DE L'ÉTUDE.....	104
COMPARAISON DES RÉSULTATS AVEC CEUX DE L'ÉQUIPE DE BASKURT ET AL.....	105
<i>Différences entre les protocoles.....</i>	<i>106</i>
<i>Réinterprétation des résultats obtenus par Baskurt et al. en fonction des conclusions de notre étude.....</i>	<i>108</i>
PERSPECTIVES FUTURES.....	109
<b>SOURCES DOCUMENTAIRES .....</b>	<b>110</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>118</b>
MODE DE CALCUL VEVO 770 .....	118

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1 : COMPARAISON DU TAUX DE CALCIUM IONISÉ AVANT ET APRÈS LA PROCÉDURE DE TRANSFUSION SANGUINE ( $N = 3$ RATS). .....	63
TABLEAU 2 : NUMÉRO D'IDENTIFICATION, ET POIDS DES RATS DANS LES DEUX GROUPES. POIDS 280-360 G.....	69
TABLEAU 3 : DÉLAIS DE SACRIFICE DES RATS SUITE À LA TRANSFUSION.....	77
TABLEAU 4 : DIFFÉRENCES STATISTIQUES ENTRE LES DEUX GROUPES SELON LES PARAMÈTRES OBSERVÉS. ....	91

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: PRINCIPAUX FACTEURS INFLUENÇANT LA PRESSION SANGUINE. ....	18
FIGURE 2: SCHÉMA DES ADAPTATIONS ENTRAÎNÉES PAR LE BARORÉFLEXE LORS D'UNE FLUCTUATION DE LA PRESSION ARTÉRIELLE. (AII : ANGIOTENSINE II).....	23
FIGURE 3: RÔLE DU BARORÉFLEXE DANS LE MAINTIEN DE LA VALEUR CIBLE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE. (PAM : PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE).....	24
FIGURE 4: RÉGULATION RÉNALE DE LA RÉABSORPTION DU SODIUM ET DE L'EAU : FACTEURS CONTRIBUTANT À MAINTENIR LE VOLUME SANGUIN ET LA PRESSION ARTÉRIELLE. (Na <sup>+</sup> : SODIUM, K <sup>+</sup> : POTASSIUM, AI : ANGIOTENSINE I, AII : ANGIOTENSINE II, ECA: ENZYME DE CONVERSION DE L' ANGIOTENSINE) .....	27
FIGURE 5: REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE LA MONOXYDE D'AZOTE SYNTHASE. (O <sub>2</sub> : OXYGÈNE, H <sup>+</sup> : HYDROGÈNE, NADPH : NICOTINAMIDE ADÉNINE DINUCLÉOTIDE PHOSPHATE, e <sup>-</sup> : ÉLECTRON, FAD : FLAVINE ADÉNINE DINUCLÉOTIDE, FMN : FLAVINE MONONUCLÉOTIDE, Fe : FER, BH <sub>4</sub> : TÉTRAHYDROBIOPTÉRINE, Ca <sup>2+</sup> : CALCIUM). ADAPTÉ DE (52). ....	33
FIGURE 6: REPRÉSENTATION DE LA CASCADE DE SIGNALISATION IMPLIQUÉE DANS LA RELAXATION DÉPENDANTE DE L'ENDOTHÉLIUM DU MUSCLE LISSE. (Ca <sup>2+</sup> : CALCIUM, NO : MONOXYDE D'AZOTE, L-NAME, L-NMMA ET L-NA : ANALOGUE STRUCTURAUX DE LA L-ARGININE, GMPC : GUANOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE, GTP : GUANOSINE TRIPHOSPHATE, PKG : PROTÉINE-KINASE G, K <sup>+</sup> : POTASSIUM, KCa : CANAUX POTASSIQUES RÉGLÉS PAR LE CALCIUM). ADAPTÉ DE (53). ....	34
FIGURE 7: VISCOSITÉ APPARENTE SELON LE DIAMÈTRE VASCULAIRE. ADAPTÉ DE (58). ....	45
FIGURE 8: SCHÉMA DE LA PROCÉDURE POUR LA TRANSFUSION DE SANG PAR ÉCHANGE DE GLOBULES ROUGES MODIFIÉS.....	51
FIGURE 9 : STRUCTURE MOLÉCULAIRE DU VYBRANT DIL.....	57
FIGURE 10 : STRUCTURE CHIMIQUE D'UN « PLURONIC » ET SON BLOC DE COPOLYMÈRE (REPRODUIT DE (70)). ....	59
FIGURE 11: IMPACT DU TRAITEMENT AGRÉGEANT SUR LA COURBE DE VISCOSITÉ EN FONCTION DU TAUX DE CISAILLEMENT. ....	60
FIGURE 12 : ANATOMIE DE LA PATTE ARRIÈRE D'UN RAT. ....	62
FIGURE 13 : OBSERVATION D'UN ÉCHANTILLON SANGUIN DE RAT AYANT ÉTÉ TRANSFUSÉ AVEC DU SANG TRAITÉ AU F98 ET MARQUÉ AU VYBRANT DIL. (IMAGES À 15 JOURS POSTTRANSFUSION). .	68
FIGURE 14 : SCHÉMA DE LA PROCÉDURE POUR LE SUIVI LONGITUDINAL DES VARIABLES HÉMODYNAMIQUES ET CARDIOVASCULAIRES. ....	71
FIGURE 15 : SEGMENTATION EN MODE B D'UNE IMAGE TYPE DU VENTRICULE GAUCHE EN COUPE LONGITUDINALE D'UN CŒUR DE RAT. ....	74
FIGURE 16 : SCHÉMA DE LA PROCÉDURE POUR L'ÉVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE. ....	78

## LISTE DES GRAPHIQUES

GRAPHIQUE 1 : ÉVOLUTION DE LA PRESSION SYSTOLIQUE DE LA QUEUE CHEZ LE RAT EN FONCTION DU TEMPS POST TRANSFUSION, SOUS ANESTHÉSIE À 2% D'ISOFLURANE. LE JOUR 0 CORRESPOND À LA MESURE EFFECTUÉE AVANT LA TRANSFUSION DES GLOBULES ROUGES MODIFIÉS AU POLYMÈRE F68 ET F98. LES BARRES D'ERREURS INDIQUENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES. ....	84
GRAPHIQUE 2 : ÉVOLUTION DU DÉBIT CHEZ LE RAT EN FONCTION DU TEMPS POST TRANSFUSION, SOUS ANESTHÉSIE À 2 % D'ISOFLURANE. LE JOUR 0 CORRESPOND À LA MESURE EFFECTUÉE AVANT LA TRANSFUSION DES GLOBULES ROUGES MODIFIÉS AU POLYMÈRE F68 ET F98. LES BARRES D'ERREURS INDIQUENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES. UNE ÉTOILE $P < 0.05$ , DEUX ÉTOILES $P < 0.001$ . ....	85
GRAPHIQUE 3 : ÉVOLUTION DU RYTHME CARDIAQUE CHEZ LE RAT EN FONCTION DU TEMPS POST TRANSFUSION, SOUS ANESTHÉSIE À 2% D'ISOFLURANE. LE JOUR 0 CORRESPOND À LA MESURE EFFECTUÉE AVANT LA TRANSFUSION DES GLOBULES ROUGES MODIFIÉS AU POLYMÈRE F68 ET F98. LES BARRES D'ERREURS INDIQUENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES. LA LETTRE A SUR LE GRAPHIQUE INDIQUE LES DIFFÉRENCES PAR RAPPORT AU JOUR SIX ALORS QUE LA LETTRE B A ÉTÉ UTILISÉE POUR NOTER LA DIFFÉRENCE AVEC LE JOUR TROIS. ( $P < 0.05$ ).....	87
GRAPHIQUE 4 : ÉVOLUTION DE LA FRACTION D'ÉJECTION CHEZ LE RAT EN FONCTION DU TEMPS POST TRANSFUSION, SOUS ANESTHÉSIE À 2% D'ISOFLURANE. LE JOUR 0 CORRESPOND À LA MESURE EFFECTUÉE AVANT LA TRANSFUSION DES GLOBULES ROUGES MODIFIÉS AU POLYMÈRE F68 ET F98. LES BARRES D'ERREURS INDIQUENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES. ....	88
GRAPHIQUE 5 : ÉVOLUTION DU VOLUME SYSTOLIQUE EN FONCTION DU TEMPS POST TRANSFUSION, SOUS ANESTHÉSIE À 2% D'ISOFLURANE. LE JOUR 0 CORRESPOND À LA MESURE EFFECTUÉE AVANT LA TRANSFUSION DES GLOBULES ROUGES MODIFIÉS AU POLYMÈRE F68 ET F98. LES BARRES D'ERREURS INDIQUENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES. UNE ÉTOILE $P < 0.05$ , DEUX ÉTOILES $P < 0.001$ . ....	89
GRAPHIQUE 6 : ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE EN FONCTION DU TEMPS POST TRANSFUSION, SOUS ANESTHÉSIE À 2% D'ISOFLURANE. LE JOUR 0 CORRESPOND À LA MESURE EFFECTUÉE AVANT LA TRANSFUSION DES GLOBULES ROUGES MODIFIÉS AU POLYMÈRE F68 ET F98. LES BARRES D'ERREURS INDIQUENT L'ÉCART-TYPE DES MESURES. ....	90
GRAPHIQUE 7 : RÉPONSE DILATATRICE RELATIVE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DES RATS UN MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES.....	92
GRAPHIQUE 8 : RÉPONSE DILATATRICE RELATIVE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DES RATS SIX MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES.....	93
GRAPHIQUE 9 : RÉPONSE DILATATRICE RELATIVE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DES RATS HUIT MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE. ....	93
GRAPHIQUE 10 : RÉPONSE DILATATRICE RELATIVE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DE TOUS LES RATS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES. ....	94
GRAPHIQUE 11 : RÉPONSE RELATIVE VASCULAIRE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DES RATS UN MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE DE NITROPRUSSATE DE SODIUM. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES. ....	95
GRAPHIQUE 12 : RÉPONSE RELATIVE VASCULAIRE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DES RATS SIX MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE DE NITROPRUSSATE DE SODIUM. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES. ....	95
GRAPHIQUE 13 : RÉPONSE RELATIVE VASCULAIRE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DES RATS HUIT MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE DE NITROPRUSSATE DE SODIUM. ....	96
GRAPHIQUE 14 : RÉPONSE RELATIVE VASCULAIRE DU VAISSEAU MÉSENTÉRIQUE DE TOUS LES RATS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE DE NITROPRUSSATE DE SODIUM. LES ASTÉRISQUES	

INDIQUENT UNE DIFFÉRENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES DEUX GROUPE ( $p < 0.05$ ). LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES. ....	96
GRAPHIQUE 15 : RÉPONSE MAXIMALE DILATATRICE DES VAISSEAUX MÉSENTÉRIQUES DES RATS UN MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE EN PRÉSENCE D'UNE DOSE DE $3,00 \cdot 10^{-3}$ MOL/L DE L-NAME. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES.....	98
GRAPHIQUE 16 : RÉPONSE MAXIMALE DILATATRICE DES VAISSEAUX MÉSENTÉRIQUES DES RATS SIX MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE EN PRÉSENCE D'UNE DOSE DE $3,00 \cdot 10^{-3}$ MOL/L DE L-NAME. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES.....	98
GRAPHIQUE 17 : RÉPONSE MAXIMALE DILATATRICE DES VAISSEAUX MÉSENTÉRIQUES DES RATS HUIT MOIS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE EN PRÉSENCE D'UNE DOSE DE $3,00 \cdot 10^{-3}$ MOL/L DE L-NAME. ....	99
GRAPHIQUE 18 : RÉPONSE MAXIMALE DILATATRICE DES VAISSEAUX MÉSENTÉRIQUES DE TOUS LES RATS POST TRANSFUSION EN FONCTION DE LA DOSE D'ACÉTYLCHOLINE EN PRÉSENCE D'UNE DOSE DE $3,00 \cdot 10^{-3}$ MOL/L DE L-NAME. LES BARRES REPRÉSENTENT LES ÉCARTS-TYPES. ....	99

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

A : aire du ventricule gauche  
Abs<sub>max</sub> : absorption maximale  
Ach : acétylcholine  
ADN : adénoside dinucléotide  
ADH : hormone antidiurétique  
AI : angiotensine I  
AII : angiotensine II  
AMPK : adénosine monophosphate kinase  
ANP : peptide natriurétique auriculaire  
ARNm : adénosine ribonucléotide messenger  
BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine  
BSA : albumine provenant de sérum bovin  
Ca<sup>2+</sup> : calcium  
CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium  
CaMKII : Calmoduline kinase II  
cP : centipoise  
CCPA : Conseil canadien de la protection des animaux  
CIPA : Comité interne de la protection des animaux  
CHUM : Centre hospitalier de l'Université de Montréal  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
d : diamètre artériel interne en fin de diastole  
DSA : dénervation sinoaortique  
e<sup>-</sup> : électron  
EC50 : concentration équivalente à 50 % de la réponse maximale  
EC75 : concentration équivalente à 75 % de la réponse maximale  
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine  
ECG : électrocardiogramme  
EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique  
Em<sub>max</sub> : émission maximale  
ET-1 : endothéline-1  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
FAP : facteur activateur des plaquettes  
Fe : fer  
FMN : flavine mononucléotide  
g : gramme  
g/mol : gramme par mole  
G : gage (unité de mesure pour le diamètre des aiguilles)  
GMPc : guanosine monophosphate cyclique  
GTP : guanosine triphosphate  
H<sup>+</sup> : hydrogène  
HCl : chlorure d'hydrogène

K<sup>+</sup> : potassium  
KCl : chlorure de potassium  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : dihydrogénophosphate de potassium  
L : longueur du ventricule  
L-NAME : (G)-nitro-L-arginine methyl ester  
M : molaire  
m<sup>2</sup> : mètre carré  
meq : milliéquivalence  
mg/kg : milligramme par kilogramme  
mg/mL : milligramme par millilitre  
MgSO<sub>4</sub> : sulfate de magnésium  
MHz : méga hertz  
mL : millilitre  
mm : millimètre  
mmHg : millimètre de mercure, unité de pression  
mOsm/kg : milliosmole par kilogramme  
MMP : métalloprotéinases  
mM : millimolaire  
MRVL : médulla rostroventrolatérale  
Na<sup>+</sup> : sodium  
NaCl : chlorure de sodium  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium  
NaOH : hydroxyde de sodium  
NE : norépinéphrine  
NO : monoxyde d'azote  
NOS : monoxyde d'azote synthase  
O<sub>2</sub> : oxygène  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> : superoxyde  
ONOO<sup>-</sup> : peroxydinitrite  
Pa : pascal  
PAM : pression artérielle moyenne  
PGI<sub>2</sub> : prostacycline  
PEG : poly(éthylène) glycol  
PKA : protéine kinase A  
PKB : protéine kinase B  
PKG : protéine-kinase G  
PNF : procédure normalisée de fonctionnement  
PPG : poly(propylène) glycol  
SNC : système nerveux central  
SNC-PAM : système nerveux central - pression artérielle moyenne  
SNP : nitroprussiate de sodium  
SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone  
V : volume  
v<sub>m</sub> : vitesse moyenne du flot  
γ : taux de cisaillement

$\mu\text{L}$  : microlitre  
 $\mu\text{m}$  : micromètre  
 $\mu\text{M}$  : micromolaire  
 $^{\circ}\text{C}$  : degré Celcius

## REMERCIEMENTS

Écrire un mémoire est un travail de longue haleine qui ne peut être réalisable sans la contribution et le support de nombreux collaborateurs et partenaires.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Guy Cloutier (Laboratoire de biorhéologie et d'ultrasonographie médicale - LBUM, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal et Département de radiologie, radio-oncologie et médecine nucléaire et Institut de génie biomédical, Université de Montréal), qui, par ses précieux conseils, m'a permis de relever le défi de cette expérience académique fort enrichissante. Merci de m'avoir aidé à repousser les limites de mes connaissances et de m'avoir initié à la recherche scientifique. Je tiens également à remercier le « National Institute of Health » (NIH) qui a apporté une aide financière à l'équipe de mon directeur de recherche pour un projet relié à la thématique de cette maîtrise.

Sans la précieuse contribution des Drs Jonathan K. Armstrong et Herbert J. Meiselman (Department of Physiology and Biophysics, University of Southern California, Los Angeles, California, USA), cette recherche n'aurait pu voir le jour, puisqu'ils nous ont gracieusement fourni les copolymères nécessaires aux expérimentations, merci.

Je souligne aussi tout particulièrement l'aide, les conseils, les encouragements et les nombreuses ressources de la vétérinaire en chef du CHUM, la Dr Hélène Héon (Service d'animalerie, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal), sans qui je n'aurais jamais réussi à mettre au point une procédure chirurgicale de transfusion de cette envergure.

Merci mille fois à ma complice de tous les moments passés avec nos amis les animaux, Nancy Beauchemin (Service d'animalerie, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal). Nancy, tu es la meilleure technicienne que j'aurais pu souhaiter avoir à mes côtés dans les moments les plus fous de rires comme de panique.

À mon idole Ekatherina (Stoyanova), je t'écrirais des éloges, mais tu les as déjà entendu un milliard de fois de ma bouche. Tu as été mon inspiration et ma conseillère numéro un.

Merci au Dr Louise Allard qui m'a donné des idées, des directives et beaucoup d'encouragements lors de la rédaction et de la structuration de ce travail.

Boris (Chayer), Jérémie (Fromageau) et François (Yu), vous avez été mes super héros dans les moments où seul l'un de vous pouvait avoir la clé du problème. Merci le LBUM d'être une famille aussi accueillante

. Enfin, merci à ma famille d'être toujours à mes côtés et de croire en moi.

.

## **CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE**

Les mécanismes de régulation de la pression sanguine font partie intégrante de l'équilibre dynamique maintenu par l'homéostasie. Le système cardiovasculaire, le système rénal et le système nerveux sont les principaux joueurs impliqués dans la régulation systémique de la pression (1, 2). D'un point de vue local, l'endothélium vasculaire est déterminant dans la modification du débit sanguin (3, 4, 5). La présente revue de la littérature permettra de mettre en liens les différents moyens de contrôle de la pression sanguine. Dans le but de faire le pont entre le comportement rhéologique du sang et la régulation de la pression, nous décrirons comment les travaux de Baskurt et ses collaborateurs (6) ont permis l'élaboration d'un projet visant à mettre en lien ce phénomène et la régulation de la pression sanguine.

### ***LES FACTEURS INFLUENÇANT LA PRESSION SANGUINE***

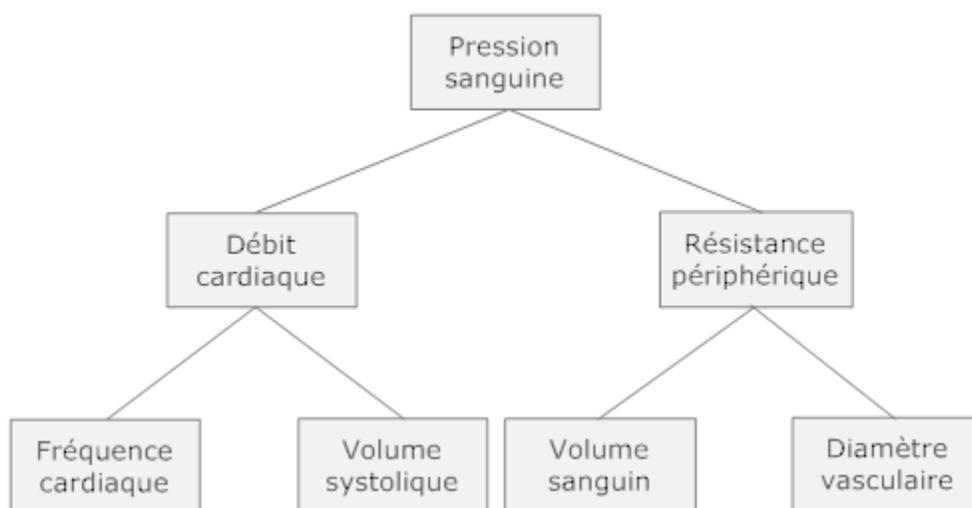
#### **Les paramètres de la pression sanguine**

##### ***Définition***

La pression sanguine est définie par la force que le sang exerce sur la paroi interne des vaisseaux sanguins. Elle est nécessaire à la circulation continue du sang dans l'organisme. Une pression élevée pousse le sang vers les régions de pression plus faible. Le sang étant propulsé par une pompe (le cœur) dans un circuit de conduits fermé (le réseau vasculaire), la pression sanguine est donc à son maximum dans les artères de gros calibre qui se trouvent à proximité du cœur et diminue le long du réseau vasculaire. Ainsi, celle-ci suit un gradient de pression en passant des artères à pression élevée aux veines à pression beaucoup plus faible (7).

### *Facteurs de la pression sanguine*

Du point de vue systémique, la pression peut être modulée par deux effecteurs principaux : le système cardiovasculaire qui comprend le cœur et les vaisseaux périphériques et le système rénal qui a une action moins directe et moins immédiate. Ainsi, tel qu'illustré à la figure 1, une augmentation de la pression peut soit provenir d'une augmentation de la résistance périphérique, soit être la résultante d'une augmentation du débit cardiaque. Toutefois, comme nous le verrons plus loin, plusieurs facteurs peuvent influencer la résistance périphérique et le débit, ce qui multiplie les variables impliquées. Certaines jouent un rôle à court terme et d'autres à long terme. L'intégration des différentes interactions entre les systèmes de contrôle permet de mieux comprendre la régulation systémique de la pression (7).



**Figure 1: Principaux facteurs influençant la pression sanguine.**

### *Facteurs influençant le débit cardiaque*

La figure 1 permet de voir que le débit cardiaque est une résultante du volume systolique (phase de contraction des chambres cardiaques) et de la fréquence cardiaque; le volume systolique étant le volume éjecté par un ventricule à chaque battement et la fréquence étant le nombre de contractions cardiaques à la minute.

Selon la loi de Starling, le facteur déterminant le volume systolique est le degré d'étirement que présentent les myocytes cardiaques juste avant la contraction (8). Plus ils sont étirés, plus forte sera la contraction. Le principal facteur de l'étirement du muscle est le retour veineux, soit la quantité de sang qui retourne au cœur ou le volume qui distend le ventricule. Chez une personne en santé, le volume systolique est habituellement constant, mais la fréquence cardiaque s'ajustera et prendra la relève si le volume sanguin diminue abruptement ou que le cœur s'affaiblit. Bien que le cœur soit indépendant du système nerveux autonome, il peut être influencé temporairement par ce dernier et cela en fait le plus important régulateur du rythme cardiaque. Des substances chimiques comme les hormones auront aussi un effet sur le débit (exemple : l'adrénaline) (9).

### ***Facteurs influençant la résistance périphérique***

La résistance périphérique peut quant à elle être décrite comme la force résultante de la friction du sang contre la paroi des vaisseaux. Tel qu'illustré à la figure 1, le facteur affectant le plus la résistance périphérique est le diamètre vasculaire, modifié selon la contraction ou la relaxation des muscles lisses vasculaires qui peut être contrôlée par le système nerveux autonome sympathique au niveau artériolaire (rétrécissement de la lumière du vaisseau). Contrairement au cœur où le système nerveux parasympathique exercera un certain contrôle, c'est la partie sympathique qui aura un rôle important au niveau vasculaire et réagira à différents facteurs (exemple : le stress) pour modifier le diamètre des vaisseaux (via la contraction pour cet exemple) (10). Les reins disposeront quant à eux du contrôle du volume sanguin, en équilibrant les échanges d'eau entre le sang et l'urine (11). Mentionnons finalement que la température, certaines autres substances chimiques (exemples : le monoxyde d'azote, l'endothéline I, l'angiotensine II, la bradykinine, l'histamine, les prostacyclines, etc.) et le régime alimentaire peuvent influencer les paramètres vasculaires.

### ***Réponse multifactorielle***

Ainsi, la régulation de la pression sanguine est multifactorielle. L'interaction de ces différents facteurs rend l'intégration de la réponse cardiovasculaire très complexe et tous les mécanismes qui l'influencent ne sont probablement pas encore élucidés (12, 13). De plus, puisque la pression systémique est maintenue de façon homéostatique, c'est-à-dire de façon à maintenir un équilibre dynamique aux alentours d'une valeur cible, elle n'est pas constante et démontre beaucoup de variabilité. Nous soulignerons donc dans les paragraphes qui suivent l'importance de l'homéostasie dans la régulation du système cardiovasculaire, puisqu'elle permet de faire l'intégration des systèmes jouant sur la pression sanguine (14)

### **L'homéostasie**

#### ***Définition***

L'homéostasie est la capacité de l'organisme à maintenir une stabilité relative du milieu interne malgré les fluctuations constantes de son environnement. L'homéostasie n'implique pas que les conditions internes ne changent pas, mais plutôt que l'équilibre soit maintenu de façon dynamique dans des limites relativement étroites. Généralement, lorsque l'organisme fonctionne bien et que ses besoins sont satisfaits, on peut dire que l'homéostasie est maintenue. Dans le cas de la pression artérielle, l'homéostasie fait en sorte qu'elle soit ajustée constamment pour acheminer le sang aux organes à un débit optimal. C'est la communication adéquate entre les différents systèmes qui permet le maintien de cet équilibre dynamique (7).

#### ***Déséquilibre homéostatique***

L'importance de l'homéostasie est telle qu'une condition pathologique est la plupart du temps liée à un déséquilibre homéostatique. Dans le cas du système

cardiovasculaire, un déséquilibre chronique entraîne des conditions pathologiques comme l'hypertension ou l'athérosclérose (7).

### *Différents systèmes homéostatiques*

Pour qu'un système de régulation soit qualifié d'homéostatique, les communications entre le récepteur, le centre de régulation et l'effecteur sont essentielles. Ce type d'organisation se retrouve à plusieurs niveaux physiologiques, autant systémiques que locaux. Nous présenterons cette section en deux volets : le volet A discutant des mécanismes homéostatiques systémiques de la régulation de la pression, et le volet B présentant la régulation locale du système vasculaire en réponse au flot. Dans le volet A, nous expliquerons le rôle du système nerveux autonome comme centre d'intégration. Nous décrirons ensuite les deux systèmes effecteurs majeurs du maintien de la pression : le système cardiovasculaire et le système rénal. Le volet B abordera les adaptations locales en fonction des fluctuations rhéologiques. La cellule endothéliale sera traitée comme le centre d'intégration, alors que l'effecteur correspondra aux vaisseaux de résistances.

## ***LE RÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DANS LA RÉGULATION DE LA PRESSION SANGUINE***

### **A. Système régulateur systémique**

Bien que le système cardiovasculaire et le système rénal aient tous deux des systèmes régulateurs locaux distincts, ils ont comme point commun d'être influencés par la médulla rostroventrolatérale (MRVL) au cerveau, d'où part des efférences nerveuses jusqu'aux zones effectrices (15). Chacun des deux systèmes a aussi des valeurs physiologiques à maintenir dans une fenêtre de variation. Lorsque la valeur passe un certain seuil accepté, l'équilibre dynamique est maintenu par les mécanismes de rétrocontrôle.

## **Le système nerveux comme centre d'intégration de la pression sanguine**

### ***Rôle du système nerveux autonome***

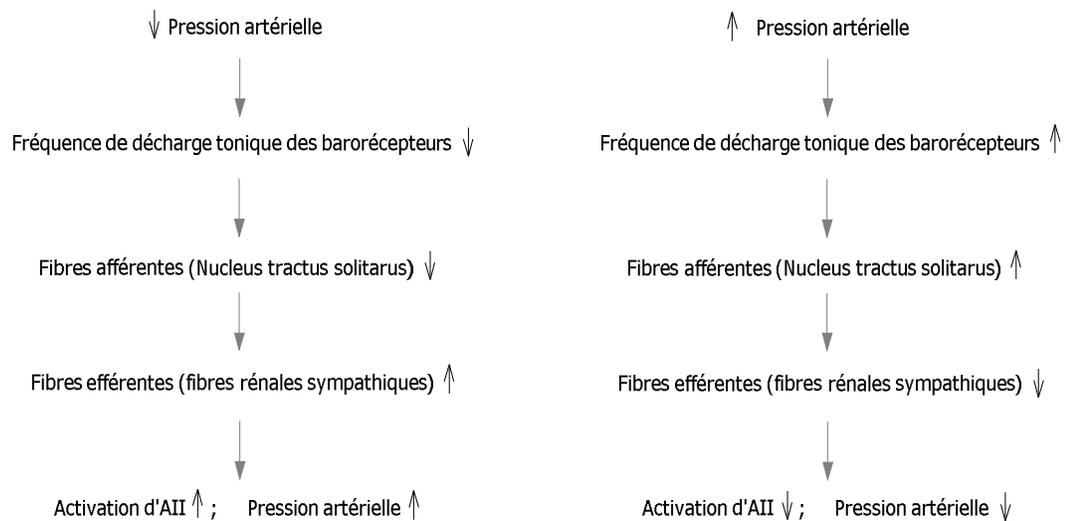
Le système nerveux autonome est important dans le maintien de la pression sanguine et est le centre responsable de vérifier que la valeur de pression se situe dans les limites acceptées par l'organisme. Il commande aux effecteurs les adaptations nécessaires pour maintenir la pression sanguine à l'intérieur d'une fenêtre adéquate de valeurs pour assurer la perfusion optimale des tissus. La partie sympathique, associée à la norépinéphrine (NE), et la partie parasympathique, associée à l'acétylcholine (Ach), ont des actions antagonistes (ou opposées). Le système sympathique mobilise l'organisme alors que le système parasympathique favorise la détente et l'économie d'énergie. Une diminution de l'activité parasympathique entraîne indirectement une augmentation du système sympathique, car ils sont en opposition (9).

### **Le système cardiovasculaire comme effecteur dans la régulation de la pression sanguine**

Lorsque le tonus parasympathique diminue (diminution de la libération d'Ach), la fréquence cardiaque s'accélère et augmente la pression artérielle. À l'inverse, lorsque le tonus sympathique est augmenté (augmentation de la libération de NE), le système vasculaire se contracte. Le parasympathique exerce son influence sur la fréquence cardiaque et le système sympathique a une prédominance sur le muscle vasculaire lisse et le diamètre vasculaire. Il existe toutefois une boucle de contrôle majeure connue comme un réflexe, puisque celle-ci est opérée de façon inconsciente. Cet axe de contrôle est le baroréflexe ou le réflexe des barorécepteurs (12, 16, 17, 18).

### *Le réflexe des barorécepteurs*

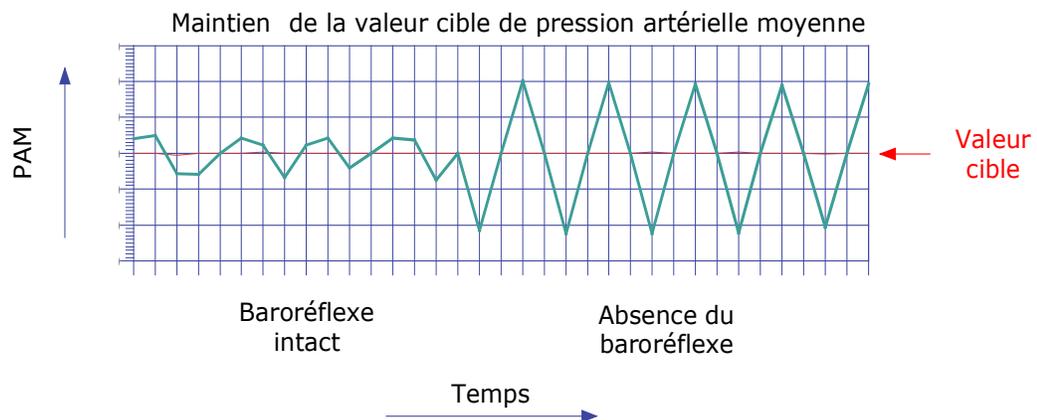
Le baroréflexe enregistre les variations de pression aux sinus carotidiens et aortiques (récepteurs). En conditions physiologiques, il joue un rôle rapide et efficace sur l'homéostasie de la pression. Ce système comprend des afférences nerveuses ayant comme encrage les barorécepteurs à la crosse aortique (circulation périphérique) et à l'entrée des carotides (circulation cérébrale). Lorsque les barorécepteurs sont stimulés par la pression, ils envoient un signal inhibiteur du système sympathique au centre d'intégration. Ce réflexe sert de frein à l'activité sympathique, modifie rapidement le rythme cardiaque (fréquence) et diminue ensuite la résistance périphérique en ajustant la quantité et le type de neurotransmetteurs (Ach et NE) libérés. Le baroréflexe est donc un rétrocontrôle inhibiteur rapide pour les augmentations de pression. Il diminue son activité lorsqu'une chute de pression se produit de façon à diminuer le tonus vagal (parasympathique) et laisser le système sympathique prendre la relève (Figure 2) (12, 16, 17, 18).



**Figure 2: Schéma des adaptations entraînées par le baroréflexe lors d'une fluctuation de la pression artérielle.** (AII : Angiotensine II).

Il semble qu'une valeur cible de l'activité nerveuse sympathique et de la pression artérielle à long terme existe au niveau du système nerveux central, mais

elles seraient opérées indépendamment du réflexe des barorécepteurs (14). Dans les cas où l'on élimine le baroréflexe (par dénervation sinoaortique (DSA)), la régulation dynamique du système est perturbée et devient plus simple, moins complexe de nature, mais plus variable (plus d'amplitude dans les variations de pression aux alentours de la valeur cible). C'est-à-dire qu'en conditions physiologiques, les barorécepteurs artériels et cardiopulmonaires réduisent la variabilité de la pression sanguine, mais la rendent beaucoup moins prévisible (voir figure 3). D'ailleurs, suite à une DSA chez certaines espèces étudiées (chien, lapin, rat), il n'y a aucune augmentation chronique de la pression observée, mais plutôt une augmentation de l'amplitude de sa variabilité (19). De plus, une remise à zéro des barorécepteurs est complète à l'intérieur d'un délai de 48 heures, de manière à soutenir les changements de pression artérielle moyenne à long terme en modifiant la valeur cible acceptée par le centre d'intégration. En d'autres mots, si le baroréflexe est stimulé de façon constante, une nouvelle valeur de pression cible est acceptée (20). Ces deux observations sont les arguments soutenant l'indépendance du contrôle à long terme de la pression par les barorécepteurs. Il est donc présentement bien connu que le baroréflexe est un mécanisme tampon puissant pour contenir les variations à court terme des fluctuations de pression artérielle, mais son rôle à long terme n'est plus clair depuis l'émergence de nouvelles observations (12, 16, 21, 22, 23, 24, 25).



**Figure 3: Rôle du baroréflexe dans le maintien de la valeur cible de la pression artérielle moyenne.** (PAM : Pression artérielle moyenne).

Ces nouvelles observations ont été faites à l'aide d'un nouveau modèle expérimental connu comme le modèle du « unloading » des barorécepteurs mis au point par Thrasher (26). Dans ce modèle, les afférences aortiques et celles d'une carotide ont été abolies. L'autre carotide a été gardée intacte, mais une ligature sous l'innervation sinusale a permis la décharge chronique des barorécepteurs via la diminution de la pression de perfusion à la zone des barorécepteurs intacts. Cette intervention a permis de constater qu'une diminution de l'afférence des barorécepteurs artériels intacts entraîne une hypertension neurogénique soutenue, pouvant être corrigée à la valeur de pression normale en retirant la ligature. Ces observations suggèrent que ce modèle est peut-être mieux adapté à l'étude de l'implication à long terme des barorécepteurs, comparativement au modèle de DSA utilisé dans plusieurs autres études. Un autre argument penchant pour une implication à long terme des barorécepteurs est qu'il existe deux populations de ces récepteurs. Celles avec des afférences de type fibre-A (myélinisées) qui peuvent être remises à zéro, et celles de type fibre-C (non myélinisées) qui ne sont pas remises à zéro et qui pourraient peut-être jouer un rôle à long terme (27). Pour le moment, il est difficile de se prononcer quant au rôle joué à long terme par le baroréflexe sur la pression (13, 28, 29, 30).

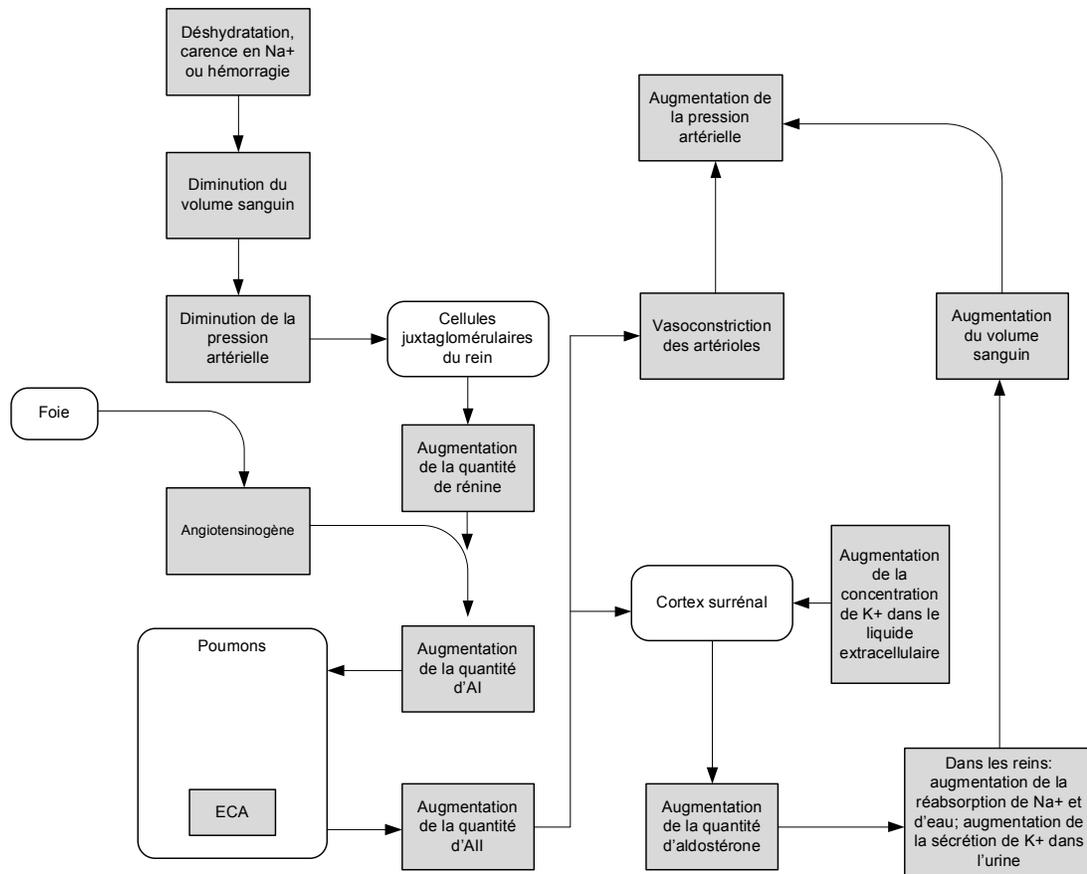
### **Le système rénal comme effecteur dans la régulation de la pression sanguine**

Parce que la pression artérielle dépend principalement du débit cardiaque et de la résistance périphérique, le rôle de l'excrétion rénale dans la régulation de la pression a souvent été négligé à tort. Pourtant, la pression sanguine sera influencée par le volume de fluide corporel et la balance en électrolytes, eux-mêmes sensibles aux facteurs neurohumoraux et aux mécanismes intrarénaux. Le maintien par le rein d'un volume sanguin stable et de la composition des électrolytes extracellulaires est essentiel pour la conservation des fonctions cellulaires et de l'homéostasie. Cet organe s'adapte pour que l'entrée et la sortie de sodium soient équivalentes et sous conditions stables. Le rein utilise les déplacements d'électrolytes (solutés) pour

déplacer l'eau (solvant) du sang vers l'urine et vice versa de façon à ajuster la natrémie et la volémie du sang. L'excrétion de sodium, dépendante de la filtration glomérulaire et de la réabsorption tubulaire (mécanismes d'excrétion urinaire), est influencée par les mécanismes intrarénaux, le changement hormonal et l'hémodynamie systémique. Elle joue un rôle crucial sur le volume sanguin (31, 32, 33).

### ***Le contrôle homéostatique du volume sanguin au niveau du rein***

Les rétrocontrôles opérés par le rein sont plus complexes que l'axe du baroréflexe, c'est-à-dire qu'ils tiennent compte de plus de signaux afférents. La régulation du volume sanguin est schématisée à la figure 4. L'excrétion rénale de sodium et d'eau ajuste le volume de fluide extracellulaire pour maintenir un volume sanguin permettant une capacité vasculaire optimale au travail cardiaque. Différentes boucles de contrôle, que nous n'expliquerons pas en détail ici, sont impliquées et différentes zones possèdent des capteurs de pression et de volume sanguin importants dans l'homéostasie des fluides. C'est le système nerveux central qui intègre les informations des différents sites et qui s'assure que les signaux efférents envoyés restaurent le volume optimal de sang. Les médiateurs connus sont l'hormone antidiurétique (ADH), le peptide natriurétique auriculaire (ANP), le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et le tonus vagal (dualité parasympathique/sympathique) (34).



**Figure 4: Régulation rénale de la réabsorption du sodium et de l'eau : facteurs contribuant à maintenir le volume sanguin et la pression artérielle.** (Na<sup>+</sup> : sodium, K<sup>+</sup> : potassium, AI : Angiotensine I, AII : Angiotensine II, ECA: Enzyme de conversion de l'angiotensine)

### *L'activité rénale sympathique*

Le consensus général veut que plusieurs cibles du système nerveux central (SNC), en plus des reins, soient impliquées dans le contrôle de la pression artérielle à long terme. L'hypothèse d'une valeur cible « système nerveux central - pression artérielle moyenne » (SNC-PAM) n'est donc pas prouvée hors de tous doutes, mais semble logique. Les éléments qui suivent interviennent dans le contrôle de l'efférence sympathique : soient la concentration d'hormones plasmatiques (perçue aux organes circumventriculaires), l'osmolalité des fluides corporels (osmorécepteurs périphériques et centraux), la pression cardiovasculaire (barorécepteurs artériels et cardiopulmonaires), le métabolisme énergétique, l'activité du système immunitaire et

le stress (16, 35). Tous ces facteurs sont perçus par le système sympathique et traduits de façon à conclure en une régulation de pression (36, 37).

Tel que mentionné, le rein est un des effecteurs sous le contrôle tonique de la MRVL, centre de régulation contrôlé de façon dynamique par l'intégration d'afférences nerveuses (ex. : barorécepteurs) et la liaison d'hormones (angiotensine II, vasopressine et aldostérone) aux organes circumventriculaires (15). L'activation rénale sympathique entraîne une relâche de rénine, une réabsorption de sodium au niveau du rein et une stimulation du tonus vasomoteur rénal, qui peuvent être freinées selon les afférences intégrées au centre de régulation. Le rein reste l'organe reconnu à ce jour comme le plus important dans la régulation à long terme de la pression sanguine (16, 35).

## **B. Systèmes régulateurs locaux vasculaires**

D'un point de vue local, un vaisseau peut répondre à différentes catégories de stimuli mécaniques, ce qui aura un impact sur la résistance périphérique et donc sur la pression. La réponse aux variations des forces mécaniques aura la même résultante en tout point du réseau microvasculaire sain, soit la variation du diamètre des vaisseaux, entraînée par la contraction ou la relaxation du muscle vasculaire lisse. Pour cette raison, il est primordial de considérer la sommation des réponses locales engendrées par la modification d'une variable physiologique. Ensuite, il est possible de les intégrer dans la réponse systémique en tenant compte de l'organisme dans son ensemble et de l'interaction des différents systèmes.

### **Les différents types de stimuli mécaniques**

Chacun des stimuli mécaniques enregistrés par le réseau vasculaire correspond à une force pour laquelle le vaisseau, selon sa structure, fixe une valeur de référence. La pression transmurale sera captée par les fibres structurales conférant

la rigidité et l'élasticité du vaisseau et sera traduite par le tonus myogène. Le tonus myogène est la tendance du vaisseau à se contracter lorsque la pression transmurale augmente et à se relâcher lorsque celle-ci diminue. La pression intravasculaire perpendiculaire à la paroi sera quant à elle captée par le muscle vasculaire lisse qui répondra par des adaptations à plus long terme si la structure vasculaire doit être modifiée, comme dans les cas d'hypertension où une rigidité de la paroi est observée suite à une augmentation chronique de la pression. Le troisième vecteur de force appliqué à la paroi est celui qui nous intéresse particulièrement et correspond au cisaillement pariétal. Celui-ci est tangentiel à l'écoulement et est capté par la cellule endothéliale qui balancera ses facteurs sécrétagogues de manière à contracter ou relaxer le muscle lisse (variation du diamètre) (38, 39, 40, 41, 42, 43, 44).

La section suivante expliquera comment l'endothélium peut agir comme centre d'intégration lorsque le cisaillement à la paroi est augmenté. Nous verrons dans un premier temps les aspects importants de la physiologie de l'endothélium, pour ensuite faire le lien entre la variation du cisaillement à la paroi et la réponse vasculaire.

## **L'endothélium**

### *L'importance de l'endothélium*

L'endothélium est une monocouche continue de cellules différenciées, ininterrompue, lisse et non thrombotique, tapissant l'intérieur du réseau vasculaire chez les mammifères. Son aire totale chez l'être humain adulte est estimée à 350 m<sup>2</sup>. C'est le cytosquelette, soit l'échafaudage qui retient chacune des cellules entre elles, qui leur permet d'être un organe distinct. La cellule endothéliale, comme tout autre type de cellule, peut communiquer avec ses pairs. Sa morphologie ainsi que différents types de récepteurs à la surface de sa membrane lui permettent d'être à l'écoute de son environnement. Elle répond à son tour en sécrétant des substances qui pourront aller stimuler les cellules avoisinantes. Les adaptations de l'endothélium

aux conditions auxquelles il est exposé jouent un rôle capital dans les désordres vasculaires associés aux pathologies cardiovasculaires. La fonction et la structure endothéliale ont donc un impact important sur le système cardiovasculaire (45, 46).

### ***Les fonctions de l'endothélium***

Au niveau fonctionnel, une bonne compréhension de la physiologie de l'endothélium est primordiale, car elle tient un rôle central dans les mécanismes de développement des désordres vasculaires. Effectivement, la cellule endothéliale est le principal régulateur de l'homéostasie vasculaire, soit le maintien d'un équilibre dynamique de la physiologie des vaisseaux. Lorsque stimulée par son environnement (activation de récepteurs), elle active ou inhibe les voies de signalisation cellulaire. L'intégration de chacune des voies résultera en la production de médiateurs physiologiques pouvant transmettre le message d'adaptation adéquat aux tissus environnants. La structure endothéliale exerce ainsi le rôle de barrière entre le sang et les tissus en plus de ses autres fonctions homéostatiques. L'endothélium influence le remodelage vasculaire via la production de facteurs de croissance et de substances inhibitrices. Ce dernier module aussi l'hémostase et la thrombose par la sécrétion de procoagulants, anticoagulants et agents fibrinolytiques. Il signale la réponse inflammatoire par l'expression d'agents chémoattractants et adhésif à la surface membranaire, en plus de réguler la contraction du muscle lisse en relâchant des agents vasoactifs (38, 41, 45).

### ***La structure de l'endothélium***

La composition structurale d'un vaisseau sanguin varie selon son type et sa localisation dans l'arbre vasculaire. Qu'il soit une veine, une artère, une veinule, une artériole ou un capillaire, la proportion de muscles vasculaires lisses, de collagène et d'élastine sera différente. Toutefois, peu importe l'endroit, on y retrouvera une monocouche de cellules endothéliales tapissant la lumière du vaisseau et adaptant sa

morphologie au flot sanguin (42). Lorsque le flot augmente, le cisaillement pariétal augmente et les cellules s'aplatissent et s'alignent dans la direction de l'écoulement. Le phénomène inverse se produit lorsque le flot diminue. Les changements morphologiques des capillaires sont particulièrement importants, car ils peuvent ralentir le flot ou le stopper. Du côté artériel (artérioles et capillaires artériels), les contraintes de cisaillement sont plus importantes que du côté veineux. La structure et la fonction vasculaire en témoignent (41, 45).

### ***La réponse vasculaire endothéliale***

La relaxation du muscle lisse vasculaire (augmentation du diamètre vasculaire) est dépendante de l'endothélium qui relâche une variété de substances vasoactives tant contractantes que relaxantes. Cette spécificité de la cellule endothéliale lui confère un rôle fondamental dans la régulation basale et dynamique de la circulation. Les facteurs vasoactifs sécrétagogues de l'endothélium les plus connus à ce jour sont le monoxyde d'azote (NO), l'endothéline-1 (ET-1), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le facteur activateur des plaquettes (FAP). Puisque ces deux derniers sont sécrétés lors de la réponse inflammatoire plutôt que de façon constitutive, nous nous attarderons plutôt au NO et à l'ET-1 qui sont impliqués dans le tonus vasculaire basal (38, 47).

### ***La collaboration entre l'endothélium et le muscle lisse***

Sans la cellule endothéliale, le muscle sous-jacent permettant le maintien du tonus vasculaire ne peut pas jouer son rôle de façon adéquate. On dit que la relaxation vasculaire est dépendante de l'endothélium, car le muscle lisse a besoin des substances relâchées par la cellule endothéliale pour se relaxer. Presque tous les stimuli qui produisent une vasodilatation le font à travers le NO, petite molécule aux propriétés lipophiliques lui permettant de diffuser à travers les membranes plasmiques. Il est clair que l'endothélium est important dans la coordination des

fonctions des tissus différenciés et qu'il participe activement à la rencontre des besoins de l'organisme dans son ensemble (38, 46, 47).

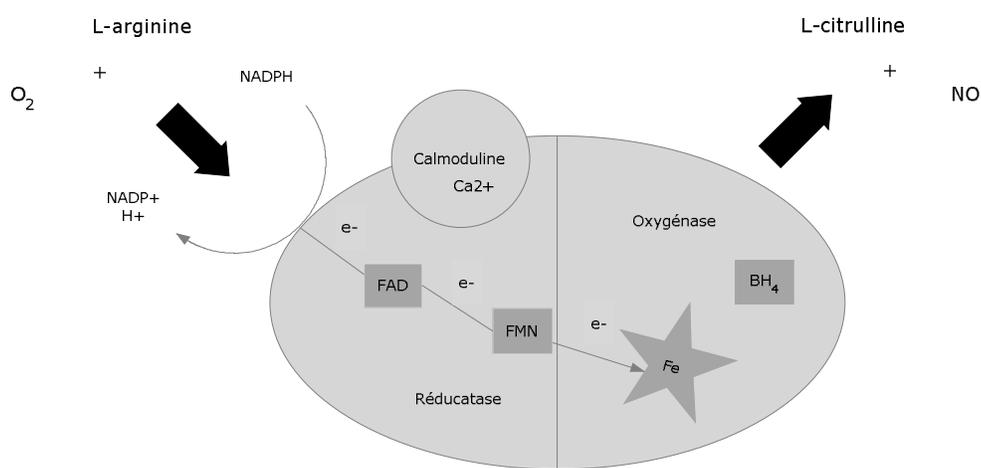
### *Le monoxyde d'azote*

L'endothélium produit une sécrétion de NO qui est constitutive à la cellule; ce qui signifie que la cellule endothéliale libère un niveau de base de NO permettant de contrôler à la hausse ou à la baisse la quantité sécrétée. Les effets hémodynamiques de l'inhibition pharmacologique du NO incluent une augmentation de la pression artérielle systémique et pulmonaire ainsi qu'une diminution du débit cardiaque (48). Notons aussi que le NO est un vasodilatateur puissant, un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de l'apoptose, un inhibiteur de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, ainsi qu'un agent antiprolifératif qui supprime la migration cellulaire du muscle lisse (49). Le NO inhibe entre autres l'expression et l'activité des métalloprotéinases (MMP) qui ont des effets positifs sur la migration cellulaire, altèrent la stabilité de la plaque athérosclérotique et permettent l'hypertrophie cardiaque, effets que l'on retrouve dans les pathologies cardiovasculaires. Le cisaillement à la paroi vasculaire et l'activation de récepteurs spécifiques sont deux stimuli entraînant l'augmentation de la sécrétion de NO. Toutefois, la sécrétion basale de NO en périphérie vasculaire est plutôt dépendante des facteurs mécaniques que de l'activation des interactions entre ligands et récepteurs (50, 51).

### *La monoxyde d'azote synthase*

L'enzyme responsable de la production de NO dans la cellule endothéliale, la monoxyde d'azote synthase (NOS), est attachée du côté cytoplasmique de la membrane. Une enzyme est une protéine ayant un rôle de catalyseur biochimique permettant d'accélérer la formation d'un produit en présence des substrats nécessaires. Les substrats de la NOS sont la L-arginine, un acide aminé basique, et l'oxygène (O<sub>2</sub>). Les produits de la réaction sont le NO et la L-citrulline. La NOS a

toutefois besoin de ses cofacteurs pour être active. La tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ) et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) sont donc nécessaires (Figure 5). Le NO produit est un radical libre gazeux ayant une demi-vie de quelques secondes *in vivo* et d'excellentes propriétés de diffusion. Lorsque la biodisponibilité du NO diminue, c'est-à-dire lorsque la quantité disponible de NO chute, il se produit une régulation positive des voies permettant d'augmenter l'activité ou l'expression des NOS selon les besoins (45, 46).



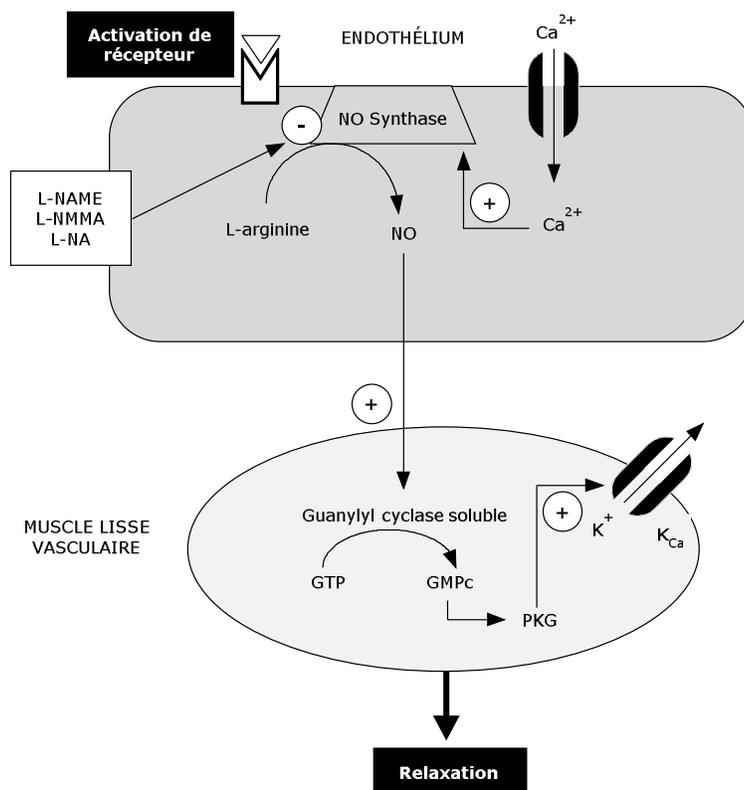
**Figure 5: Représentation graphique de la monoxyde d'azote synthase.** ( $\text{O}_2$  : oxygène,  $\text{H}^+$  : hydrogène, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate,  $\text{e}^-$  : électron, FAD : flavine adénine dinucléotide, FMN : flavine mononucléotide, Fe : fer,  $\text{BH}_4$  : tétrahydrobioptérine,  $\text{Ca}^{2+}$  : calcium). Adapté de (52).

### *L'activation de la monoxyde d'azote synthase*

La NOS fonctionne comme si elle avait un interrupteur qui peut être activé ou désactivé de différentes façons pour avoir un meilleur contrôle sur la production de NO. Il existe trois isoformes des NOS présentes dans différents types de cellules, actives dans un éventail de circonstances. La forme prédominante dans la cellule endothéliale est l'eNOS et elle passe du stade actif au stade inactif et du stade couplé au stade découplé selon la manière avec laquelle sa structure s'organise. Ces

différents états sont pour l'enzyme une façon de contrôler son activité (production de NO) (48, 50).

Les forces de cisaillement appliquées à la surface externe de la membrane cellulaire entraînent des changements de structure qui auront un impact sur l'activité de l'enzyme eNOS. L'activation de récepteurs membranaires due à ces changements entraîne une cascade de conséquences intracellulaires connues comme étant des voies de signalisation composée de plusieurs activations et/ou inhibitions en chaîne de médiateurs cellulaires. Lorsque l'activation d'eNOS en découle, elle produit le NO qui diffuse ensuite vers le muscle lisse s'il n'en est pas empêché (Figure 6) (48, 50).



**Figure 6: Représentation de la cascade de signalisation impliquée dans la relaxation dépendante de l'endothélium du muscle lisse.** ( $Ca^{2+}$  : calcium, NO : monoxyde d'azote, L-NAME, L-NMMA et L-NA : analogues structuraux de la L-arginine, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, GTP : guanosine triphosphate, PKG : protéine-kinase G,  $K^+$  : potassium,  $K_{Ca}$  : canaux potassiques réglés par le calcium). Adapté de (53).

L'activation d'eNOS se produit en quelques secondes lorsque les contraintes de cisaillement sont augmentées. Le niveau de calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaire est tout

de suite élevé et la calmoduline ira lier les ions calciques disponibles. L'activation de la calmoduline par la formation du complexe calmoduline/calcium lui permettra d'aller s'attacher à l'eNOS de façon à augmenter son activité et de générer la L-citrulline et le NO par l'oxydation de la L-arginine. C'est donc dire qu'une augmentation de calcium dans la cellule endothéliale entraîne une augmentation rapide de l'activité d'eNOS. Toutefois, la production de NO est maintenue même lorsque le niveau de calcium de la cellule retourne à son niveau de base. D'ailleurs, l'activation d'eNOS est aussi possible sans variation de la concentration de calcium intracellulaire et attachement de la calmoduline active à l'eNOS, elle est donc possible simplement par la phosphorylation de sites spécifiques de l'enzyme. Bien que les effets sur certains sites (Ser<sup>1174</sup>) soient bien décrits, l'importance fonctionnelle est encore incertaine et controversée sur la majorité de ceux-ci. Cinq sites de phosphorylation ont été proposés, dont quatre sur une sérotonine au site 1174, 635, 617 et 116, ainsi que sur une tyrosine au site 497. Les protéines kinases A, B et G (PKA, PKB, PKG), ainsi que l'adénosine monophosphate kinase (AMPK) et la calmoduline kinase II (CaMKII) ont été identifiées pour la phosphorylation de Ser<sup>1174</sup>. PKA a été identifiée pour Ser<sup>635</sup> et PKA et PKB pour S<sup>617</sup>. PKC peut aussi phosphoryler eNOS en ses sites S<sup>116</sup> et T<sup>497</sup>. AMPK peut aussi ajouter un phosphate au site T<sup>497</sup>. Pour cette raison, nous pouvons dire que l'activation d'eNOS est indépendante du calcium (48, 50).

### ***La régulation de l'expression de la monoxyde d'azote synthase***

Comme nous venons de le voir, il est possible de réguler l'activité d'eNOS. Pour contrôler la quantité de NO produite par la cellule endothéliale, celle-ci module la quantité d'enzymes exprimées dans la cellule. Lorsqu'une augmentation de l'activité de l'enzyme ne suffit pas à ramener le niveau des contraintes mécaniques détectées par les cellules endothéliales à des valeurs physiologiques normales, la cellule régule de façon positive la synthèse de la protéine. Cette réponse se produit en quelques heures puisqu'elle implique différents niveaux d'activité cellulaire, dont

celle du noyau. En effet, pour augmenter la synthèse d'eNOS, les voies de signalisation cellulaire menant au noyau vont augmenter la transcription des gènes encodant pour la protéine d'intérêt (régulation transcriptionnelle). Plus il y aura d'eNOS attachées à la membrane cellulaire, plus la réponse aux stimuli sera forte, car elle cumulera la production de NO venant de plusieurs enzymes (50).

Cet autre moyen de contrôle qu'est la régulation de l'expression de l'enzyme comprend les régulations transcriptionnelles et posttranscriptionnelles. C'est donc une réponse qui implique le génome et prend plus de temps à être délivrée, car elle implique l'activation de séquences d'ADN au noyau, la sortie de messagers au cytoplasme (ARNm) et la synthèse de protéines. Une fois les hélices d'ARNm libérées dans le cytoplasme, la stabilité de celles-ci devra être augmentée pour éviter que l'ARNm ne soit dégradé avant d'avoir pu encoder la quantité de protéines nécessaires (régulation posttranscriptionnelle). Suite à la synthèse, les eNOS iront se positionner du côté cytoplasmique membranaire de la cellule endothéliale et pourront contribuer à la production de NO permettant de relâcher le muscle vasculaire lisse en vue de diminuer les contraintes de cisaillement vasculaire à la paroi. Ceci permet à la régulation du NO d'être mieux adaptée à long terme. Si les adaptations rapides de l'activité d'eNOS ne suffisent pas aux besoins perçus par la cellule, cette réponse plus lente permettra d'atteindre les effets relaxants voulus (48, 50).

### ***La rétro-inhibition de la réponse endothéliale***

Différentes voies de signalisation cellulaire pourront activer les séquences génomiques permettant la synthèse d'eNOS. Par contre, ces mêmes voies recruteront aussi les éléments nécessaires à la rétro-inhibition de l'enzyme, de façon à doser la réponse cellulaire. Par exemple, une augmentation du cisaillement laminaire à la paroi du vaisseau active aussi la NADPH oxydase pour un délai approximatif de 24 heures. Cette enzyme est, entre autres, la source majeure de superoxydes qui peuvent aller réagir directement avec le NO et l'empêcher de jouer son rôle de vasodilatateur

vasculaire. Ces superoxydes peuvent même aller oxyder la  $BH_4$ , cofacteur de l'eNOS, ce qui engendre le découplage d'eNOS et entraîne la production de superoxydes plutôt que de NO. La superoxyde dismutase cuivre/zinc et la glutathionne peroxydase pourraient aussi être stimulées par une augmentation du cisaillement laminaire. Ces deux autres joueurs sont importants dans l'ébouage cellulaire des radicaux libres. Il faut donc toujours garder en perspective que l'activation de voies de signalisation cellulaire n'est jamais unidirectionnelle et produit souvent des effets contradictoires balancés de manière à obtenir le résultat visé (50).

Principalement, la diminution de la quantité de NO (biodisponibilité) diffusant au muscle lisse est plutôt contrôlée par la dégradation de la molécule avant qu'elle puisse avoir son effet relaxant sur le muscle. Une faible biodisponibilité du NO est majoritairement due à l'augmentation de la production de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et autres radicaux libres, substances toxiques pour la cellule, lorsque présentes en grande quantité. Lorsqu'une molécule de NO réagit avec un superoxyde, il y a formation de peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ), un oxydant proathérosclérotique (10). La perte ou l'atténuation de la biodisponibilité du NO dans l'endothélium est l'un des premiers marqueurs de la dysfonction endothéliale remarqué dans plusieurs maladies cardiovasculaires comme l'hypertension et l'athérosclérose. D'ailleurs, le niveau basal de relâche cellulaire de NO est plus élevé chez les hypertendus, pour compenser la décomposition due aux anions superoxyde et libérer la quantité de vasodilatateur nécessaire et suffisante vers le muscle afin de maintenir l'homéostasie. La décomposition du NO par les radicaux libres est donc le mécanisme majeur dans la basse biodisponibilité du NO (48).

### ***L'endothéline-1***

L'ET-1 est la contrepartie du NO et provoque une réponse antagoniste. L'ET-1 est un vasoconstricteur libéré par l'endothélium et a, comme le NO, un effet

paracrin, ce qui signifie qu'elle est produite par un type de cellule et ira agir sur un autre type de cellule. Elle est produite par la cellule endothéliale, entraîne une vasoconstriction du muscle lisse par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, en plus d'activer les voies menant à l'hypertrophie vasculaire et myocardique, ainsi que de potentialiser les effets des catécholamines. La production d'ET-1 est stimulée par l'hypoxie, le cisaillement à la paroi, l'ischémie ou l'activation de récepteurs membranaires. L'ET-1 n'est pas stockée dans les granules cellulaires, mais est plutôt produite par transcription de gènes encodant la préproendothéline, qui devra être clivée avant d'être active et jouer son rôle antagoniste au NO. L'ET-1 s'ajoute donc aux différents mécanismes vasculaires impliqués dans l'homéostasie (46).

### **Le cisaillement à la paroi vasculaire comme stimulus de la cellule endothéliale**

#### ***La cellule endothéliale comme capteur et centre d'intégration***

La cellule endothéliale perçoit son environnement soit par la liaison de différents ligands à sa membrane, soit par la reconnaissance de l'intensité des facteurs mécaniques (38). La cellule endothéliale agit donc comme interface de transduction des forces hémodynamiques impliquant de multiples éléments moléculaires. Le cisaillement est une force tangentielle frictionnelle dépendante du flot sanguin. Plusieurs senseurs mécaniques du cisaillement sont présents à la surface de l'endothélium. Les jonctions intercellulaires, ainsi que différents récepteurs (tyrosine kinase, couplée aux protéines G, canaux calciques) sont impliqués dans la détection des variations du cisaillement. Les lipides et les glycolyx membranaires jouent probablement eux aussi leur rôle. Ces différents médias par lesquels la cellule endothéliale ressent les changements lui permettent de maintenir son homéostasie cellulaire face aux variations extérieures et à son microenvironnement. À la suite de la détection d'un changement, la cellule module ses fonctions et adapte sa structure pour maintenir un équilibre dynamique des conditions physiologiques saines. En conditions normales, les adaptations permettent à la paroi vasculaire de gérer les changements de pression et de flot pour optimiser la performance de ses fonctions.

Des variations considérables sont observées dans des conditions pathologiques. La réaction aux modifications hémodynamiques locales est presque qu'immédiate sur le diamètre vasculaire (41, 48).

### ***Modification du phénotype vasculaire***

Toutefois, lorsque les adaptations vasomotrices ne sont plus suffisantes pour compenser les variations des contraintes mécaniques, le vaisseau, à l'aide de l'endothélium, ajuste son calibre et la structure de sa paroi. Le phénotype vasculaire se modifiera seulement si les mécanismes d'adaptation ne sont pas suffisants pour ramener les contraintes mécaniques à des valeurs physiologiques. L'expression différentielle de gènes permettra alors de contrôler la structure ou la fonction des vaisseaux. Les intégrines, les canaux ioniques, les protéines G, les tyrosines kinases et les radicaux libres interviennent tous dans la mécanotransduction de la cellule endothéliale et jouent un rôle dans une ou plusieurs voies de signalisation cellulaire. L'aboutissement de la résultante des activations et inhibitions des voies de signalisation dans la cellule vise à permettre le rétablissement de la contrainte de cisaillement moyenne à la surface endothéliale (41, 47).

### ***Les adaptations vasculaires dues au flot sanguin local***

Dans le cas d'une augmentation assez élevée et soutenue du cisaillement pariétal pour une longue durée en flot laminaire, une baisse de synthèse d'ADN est observée comparativement aux conditions statiques. Ainsi, le nombre de cellules entrant dans le cycle cellulaire est contrôlé. De plus, un flot laminaire est protecteur pour le vaisseau et diminue l'émergence de lésions vasculaires. Par exemple, de multiples mécanismes enclenchés par le cisaillement entraînent aussi des effets sur l'apoptose (mort cellulaire programmée); des voies de la survie cellulaire sont activées et des protéines apoptotiques sont inhibées. Les forces de cisaillement ont aussi un effet sur la migration cellulaire. Dans certaines conditions, la réponse

vasculaire à plus long terme peut entraîner le remodelage du vaisseau et en modifier son phénotype. Il est donc clair qu'il y a une interrelation entre la modulation du cisaillement et les propriétés mécaniques de la cellule, de même qu'entre les éléments structuraux intracellulaires et la mécanotransduction (41).

## NOTIONS DE BASE POUR INTERPRÉTER LE TRACÉ D'UNE COURBE DOSE-RÉPONSE

Une courbe dose-réponse permet d'observer l'intensité d'une réponse sur l'axe des ordonnées en fonction de la dose croissante d'une drogue sur l'axe des abscisses. La dose peut donc être définie par la quantité de drogue nécessaire pour atteindre une concentration appropriée de principe actif au site d'interaction entre la drogue et son récepteur. Selon l'accessibilité au site de liaison, le temps est donc aussi une variable importante à considérer. Pour éliminer le facteur temporel lors de l'interprétation d'une courbe dose-réponse, le consensus général est de considérer l'effet maximal produit par la dose donnée (54).

Un effet pharmacologique est considéré comme la conséquence d'une réaction chimique ou physicochimique réversible entre une drogue et une entité réactive de l'organisme (système en équilibre). Le réactif biologique peut être soit un récepteur ou une autre composante fonctionnelle d'importance égale (dans la plupart des cas le réactif biologique est un récepteur) (54).



Les systèmes enzymatiques fonctionnent aussi en se combinant de façon réversible avec la substance sur laquelle ils ont leur effet.



Puisque les interactions de ces deux types de systèmes sont similaires, les aspects quantitatifs sont dans les deux cas régis par un système d'équilibre chimique. Par analogie, le niveau de saturation des récepteurs par une drogue devrait être proportionnel à la dose de la drogue et au nombre de récepteurs libres et non liés. En d'autres mots, la quantité de complexes drogue-récepteur est proportionnelle à la concentration de drogue et à la concentration de récepteurs inoccupés. En retour, l'effet pharmacologique produit par une drogue devrait être dépendant de la portée de la réaction impliquée, c'est-à-dire qu'elle devrait être directement proportionnelle au nombre de récepteurs occupés par la drogue (54).

Pour la représentation d'une courbe de la réponse en fonction de la dose, une échelle logarithmique est utilisée sur l'axe des abscisses. La transformation logarithmique permet non seulement une représentation plus détaillée de la réponse à des doses très petites, mais permet aussi l'accès à un éventail de doses plus large à l'intérieur d'un même graphique (54).

La forme typique en S d'une courbe semi-logarithmique dose-réponse a de façon théorique un centre de symétrie dont le point milieu représente la dose à laquelle 50 % de l'effet maximal est obtenu. La dose provoquant 50 % de la réponse maximale est l'EC50 et permet de comparer entre elles différentes drogues ayant un même effet par un même mécanisme, puisque leurs courbes semi-logarithmiques sont pratiquement linéaires et parallèles les unes par rapport aux autres. Après ce point, telle une hyperbole, les valeurs approchent un maximum correspondant au point où le système biologique n'a plus la capacité de répondre à la stimulation. Dans plusieurs systèmes, la réponse maximale biologique est atteinte sans obtenir une saturation complète des récepteurs. Les récepteurs libres restants lorsque la réponse maximale est atteinte sont appelés les récepteurs de réserve (54).

## ***LE SANG ET SON INFLUENCE SUR LE CISAILLEMENT À LA PAROI***

### **Le sang**

C'est le système circulatoire qui est responsable de la distribution du sang dans l'organisme. Cet important système comprend le cœur et un réseau vasculaire à embranchements multiples. Divers mécanismes permettent de moduler l'écoulement de façon à perfuser les organes adéquatement (7, 55).

### ***La composition du sang***

Le sang est un mélange de différents éléments figurés et de plasma. Il est spécialisé dans le transport d'O<sub>2</sub>, de nutriments, de déchets cellulaires, d'autres substances et de chaleur. Les composantes cellulaires sont les érythrocytes (ou globules rouges), les leucocytes (ou globules blancs) et les plaquettes. Composé d'à peu près 90 % d'eau, le plasma contient des ions métalliques (sels), des gaz respiratoires, des hormones, des protéines et des déchets de même que des produits du métabolisme cellulaire. Dans des conditions de régime alimentaire sain, les divers mécanismes homéostatiques maintiennent le plasma d'une composition relativement constante. Le sang est généralement composé d'environ 45 % d'érythrocytes (proportion définissant l'hématocrite), de moins de 1 % de leucocytes et de plaquettes ainsi que de 55 % de plasma (7, 55).

### ***Le globule rouge***

Les érythrocytes, ou globules rouges, ont pour fonction essentielle d'apporter l'oxygène à toutes les cellules de l'organisme. Ce sont de petites cellules ayant une structure biconcave, c'est-à-dire que leur centre est plus mince que leur périphérie. Les globules rouges sont approximativement 1000 fois plus nombreux que les leucocytes et l'hématocrite (hématocrite : volume de globules rouges/volume de

sang) est un élément déterminant de la viscosité sanguine. Comme nous le verrons plus loin, l'agrégation des érythrocytes constitue également un facteur modulant la viscosité à bas cisaillements. Par ailleurs, l'augmentation de la viscosité du sang augmente la résistance périphérique. L'importance des érythrocytes est donc primordiale lorsqu'on parle de l'écoulement du sang dans le réseau vasculaire (56).

### ***Les facteurs sanguins modulant la résistance périphérique***

La résistance périphérique totale est définie par les propriétés géométriques du système vasculaire à tout moment, incluant les effets du tonus vasculaire sur le diamètre des vaisseaux et les propriétés rhéologiques du sang. Simplement, le comportement hémodynamique de la circulation sanguine dépend des relations entre la géométrie vasculaire, le comportement rhéologique du sang et la fonction vasculaire, incluant les réponses du muscle lisse et de l'endothélium (55).

### ***L'hémorhéologie***

L'hémorhéologie fait référence au comportement d'écoulement du sang dans le réseau vasculaire et à la façon dont le sang permet de mettre en liens les contraintes mécaniques et les déformations (exemple : viscosité). Le sang est capable de s'écouler dans des conditions physiques extrêmes avec une fluidité variant selon les caractéristiques du flot (densité, viscosité). Cette propriété est non seulement due à la composition du plasma, mais aussi à la présence et à la quantité de cellules circulantes dans le sang, aux caractéristiques de chaque type cellulaire et aux forces de cisaillement. La fluidité sanguine change donc rapidement, peut être modifiée, et entraîner par conséquent des répercussions sur la perfusion des tissus, ce qui explique notre intérêt pour la rhéologie du sang en physiologie cardiovasculaire (57, 58).

### ***La résistance à l'écoulement sanguin et le cisaillement à la paroi vasculaire***

La fonction cardiovasculaire dépend du volume sanguin (et de sa composition), du diamètre vasculaire (et de sa qualité) et du maintien de la pression par le débit cardiaque. Si ces trois paramètres restent dans les limites physiologiques, le système cardiovasculaire reste équilibré. La résistance à l'écoulement d'un liquide dans un tube est inversement proportionnelle au rayon du tube à une puissance de quatre et est directement proportionnelle à la longueur du tube et à la viscosité du fluide  $\eta$  circulant (6, 59). En étude clinique, le cisaillement pariétal (mesuré en pascal (Pa)) dont nous avons décrit le rôle sur l'endothélium vasculaire est généralement calculé selon la viscosité totale du sang et les taux de cisaillement estimés selon la vitesse du flot et le diamètre interne de l'artère (60). Voilà la formule d'estimation du taux de cisaillement :

$$\gamma = (8v_m) / d$$

où  $\gamma$  est le taux de cisaillement,  $v_m$  la vitesse moyenne du flot et  $d$  le diamètre artériel interne en fin de diastole (60).

### ***L'agrégation des globules rouges et la viscosité du sang***

La viscosité du sang a un impact sur la résistance à l'écoulement. La variation de la viscosité sanguine selon le diamètre des vaisseaux, décrite à la Figure 7, peut être expliquée par l'alignement des globules rouges (migration axiale) dans le tube capillaire, ce qui laisse une couche plasmatique lubrifiée dans la zone entre les globules rouges et la paroi vasculaire où les contraintes de cisaillement sont les plus fortes. L'agrégation des globules rouges est illustrée en image sur la figure 7. Dans les vaisseaux de plus gros calibres, à des taux de cisaillement plus faibles (ex. : réseau veineux), les globules rouges se regroupent (ou s'agrègent) en conformation dite de rouleaux et la viscosité apparente augmente à mesure que les agrégats se

forment. Cette structure organisationnelle en rouleaux est due aux forces d'adhésion érythrocytaire et est un processus dynamique qui s'adapte selon le flot pour optimiser la perfusion des tissus (55, 61). La viscosité sanguine et la viscosité ressentie par l'endothélium ne seront donc pas nécessairement identiques puisque les effets de la viscosité sanguine sont modifiés par la couche plasmatiche à la surface endothéliale (57, 62).

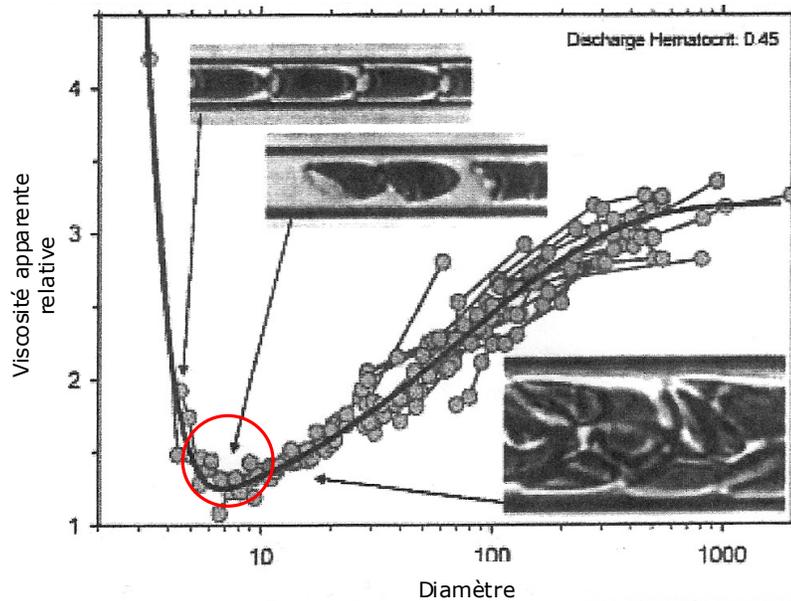


Figure 7: Viscosité apparente selon le diamètre vasculaire. Adapté de (58).

### *La résistance au flot et la viscosité*

Puisque la résistance au flot est dépendante du comportement rhéologique et de la circulation dans les microvaisseaux, les changements de la résistance impliquent soit des changements du diamètre du vaisseau, du débit cardiaque ou de la viscosité apparente du sang. Dans un organisme normal, il a été démontré que des changements de la résistance périphérique consécutifs à la viscosité sanguine étaient compensés par une réponse au niveau du cœur. Une viscosité sanguine normale (4.5 centipoise (cP)) est principalement déterminée par l'hématocrite, la viscosité du plasma et la déformabilité ainsi que l'aggrégation des globules rouges. Cette viscosité

normale est nécessaire pour obtenir une pression de distribution adéquate et pour que la circulation assure le passage des érythrocytes dans les capillaires. D'ailleurs, une augmentation modérée de la viscosité sanguine diminue la résistance périphérique via le cisaillement pariétal, la méchanotransduction et la relâche de NO par l'endothélium (62, 63, 64).

## ***LE PROJET DE RECHERCHE***

### **Modulation de l'expression de la monoxyde d'azote synthase par l'agrégation des globules rouges**

Ce projet tire son inspiration d'une étude *in vivo* observant les effets de l'agrégation érythrocytaire sur l'expression d'eNOS au niveau vasculaire. Nous décrirons brièvement cette étude et expliquerons par la suite l'objectif et l'hypothèse de ce mémoire.

En 2004, Baskurt et ses collaborateurs publient un article intitulé « Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation » (65). L'objectif était d'observer les effets d'une agrégation érythrocytaire accrue sur les mécanismes de contrôle vasculaire dépendants de l'endothélium. Un modèle de transfusion par échange de globules rouges modifiés par l'ajout d'un revêtement de polymère chez le rat a été mis au point. Ce revêtement de Pluronic F98 a pour effet d'augmenter les propriétés agrégeantes érythrocytaires. À la suite de cette transfusion, les rats étaient suivis sur une période de cinq jours où une augmentation graduelle de leur pression artérielle moyenne a été observée. Après cette période, les animaux étaient sacrifiés et une étude vasculaire *ex vivo*, conduite sur les microvaisseaux du muscle gracile, a démontré que la réponse dose-dépendante au flot et à l'acétylcholine était diminuée comparativement au groupe contrôle. De plus, une analyse de protéines avait prouvé que l'expression cellulaire d'eNOS était plus faible dans le groupe transfusé avec du sang hyperagrégeant que dans le groupe contrôle. La conclusion proposée suggérait qu'une augmentation de

l'agrégation érythrocytaire entraîne la suppression de l'expression d'eNOS menant à une altération du tonus vasomoteur, probablement due à une diminution du cisaillement à la paroi et/ou une augmentation de l'accumulation axiale des globules rouges dans le réseau vasculaire microcirculatoire (65). Dans cette étude, la diminution du cisaillement à la paroi a été supposée une résultante de la diminution locale du débit microcirculatoire. Cette nuance est importante puisque l'agrégation érythrocytaire dans la macrocirculation aplanit le profil de vitesse et résulte en une augmentation du cisaillement à la paroi (66).

Il est vrai que l'expression d'eNOS dépend des forces mécaniques auxquelles les vaisseaux sont exposés et que la production endothéliale de NO est reliée de près aux conditions hémodynamiques. De plus, l'action migratoire des globules rouges est affectée par leurs propriétés agrégeantes et diminue dans les conditions appropriées la résistance à l'écoulement. En ce sens, l'hypothèse qu'une hyperagrégation érythrocytaire entraîne une diminution de l'expression d'eNOS comme résultat d'une diminution du cisaillement pariétal lui-même entraîné par un écoulement ralenti et/ou une migration axiale plus efficace peut être logique.

Rappelons toutefois que le revêtement de polymères augmentant l'agrégation des globules rouges renforce l'association individuelle des érythrocytes ce qui implique que des forces plus importantes seront nécessaires pour briser les agrégats plus résistants à la dispersion. Cet empilage de globules rouges est donc réversible lorsque les taux de cisaillement suffisants sont appliqués. Nous ne croyons donc pas que leur hypothèse proposant que les agrégats, suivant leur axe migratoire, restent intacts dans le lit microvasculaire et favorise une couche lubrifiante plasmatisque diminuant le cisaillement à la paroi. Nous croyons plus plausible que l'augmentation de la viscosité sanguine et des forces de cisaillement dues à une augmentation de l'agrégation des globules rouges dans les gros vaisseaux soit le facteur hémodynamique le plus important. Selon notre approche, les impacts d'une hyperagrégation érythrocytaire dans les gros vaisseaux, l'augmentation de la viscosité sanguine et du retour veineux, devraient plutôt augmenter le cisaillement

patériel dans les microvaisseaux. En ce sens, une diminution de l'expression d'eNOS serait peu probable.

Nous croyons que leurs résultats proviennent de la ligature au niveau carotidien entraînant une décharge des barorécepteurs. Effectivement, il n'y a aucune garantie que les effets observés soit simplement une conséquence de la modification de l'agrégation érythrocytaire. Puisque le marqueur contrôle inhibe l'agrégation, il est possible que la combinaison des deux facteurs hémorhéologiques ait inséré un biais dans les résultats expérimentaux. En théorie, le système cardiovasculaire devrait pouvoir s'adapter à une variation d'une seule variable de façon à compenser les variations de pression. Rappelons qu'il a été démontré que la décharge des barorécepteurs entraîne une augmentation de l'amplitude de variation de la pression. Il aurait été intéressant d'observer les ajustements de la fonction cardiaque, puisqu'elle est, de même que la fonction vasculaire, directement proportionnelle à la pression artérielle moyenne.

### **Le projet**

À la lumière des observations de Baskurt et al., nous proposons d'expliquer l'impact d'une hyperagrégation érythrocytaire sur la régulation de la pression sanguine, en observant le débit cardiaque, la résistance périphérique et la fonction vasculaire. Nous développerons un protocole de transfusion sanguine chez le rat de manière à modifier l'agrégation de ses globules rouges et par le fait même augmenter sa viscosité sanguine.

S'il est vrai qu'une augmentation de l'agrégation érythrocytaire implique une diminution de l'expression d'eNOS, cette information pourrait avoir un impact notre compréhension des désordres vasculaires. Effectivement, une hyperagrégation érythrocytaire est observée dans plusieurs conditions pathologiques, tel le diabète ou les chocs anaphylactiques.

Notre variable indépendante sera l'agrégation érythrocytaire et les paramètres observés seront la pression sanguine, le débit cardiaque, la résistance périphérique et la fonction vasculaire. Bien que la variable dépendante d'intérêt soit la pression sanguine, l'hypothèse proposée, contradictoire à celle de Baskurt et al. (65), suggère que les mécanismes de l'homéostasie réussiront à maintenir cette dernière constante par divers mécanismes compensatoires influençant la pression.

L'objectif est donc de vérifier, dans le cadre d'une étude exploratoire, si la pression artérielle moyenne est maintenue suite à un échange du tiers du volume sanguin par du sang hyperagrégant et d'expliquer quels mécanismes sont impliqués pour compenser l'augmentation de la viscosité sanguine.

Un premier objectif consiste à remplacer le tiers du volume sanguin chez le rat par du sang hyperagrégant (chapitre 2). Le deuxième objectif est de suivre les rats transfusés sur 19 jours et d'observer l'évolution de la pression artérielle moyenne et les adaptations hémodynamiques à l'aide de l'échocardiographie (chapitre 3). Le dernier objectif sera de vérifier comment la fonction vasculaire s'est adaptée à long terme (un mois et plus suite à la transfusion) en observant *ex vivo* la réponse dilatatrice des vaisseaux mésentériques (chapitre 4).

Dans le but de poursuivre ces objectifs, le chapitre suivant décrit le développement d'une méthode de transfusion par canulation des vaisseaux fémoraux, de suivi longitudinal des variables cardiovasculaires et de l'évaluation de la fonction endothéliale. Le chapitre trois décrira les résultats. En terminant, le chapitre cinq récapitule les résultats et compare ces derniers avec ceux de l'étude qui a inspiré notre projet de recherche.

## **CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE**

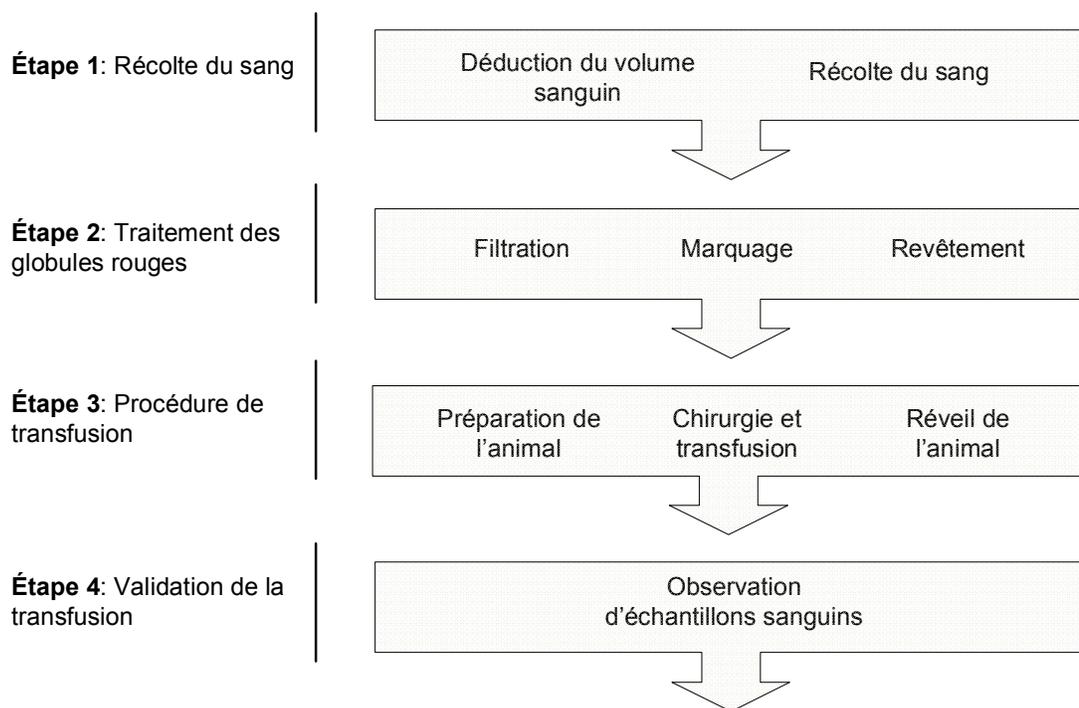
### ***LA TRANSFUSION***

Le protocole de recherche s'inspire des travaux de Baskurt et al. (65) qui ont démontré un lien entre l'hyperagrégation érythrocytaire et la régulation de l'expression d'eNOS chez le rat, à la suite d'une transfusion par échange de sang hyperagrégeant. Pour conduire la présente étude, il a donc fallu développer un modèle expérimental adéquat de transfusion par échange chez le rat de façon à contrôler le mieux possible l'agrégation des globules rouges et réduire les biais et facteurs confondants introduits par la méthode.

Le modèle expérimental a été développé chez des rats mâles adultes de souche Brown Norway pesants entre 275 g et 360 g, disponibles chez le fournisseur Charles River. Cette souche de rats a été choisie pour l'avantage qu'il a par rapport aux autres souches concernant les prédispositions aux conditions cardiovasculaires susceptibles de fausser nos données (67). Dans chaque lignée génétique, il existe des faiblesses et des prédispositions pathologiques. Cette souche de rats n'a pas un historique d'événements cardiovasculaires et est un bon contrôle pour une étude future qui pourrait être conduite sur la souche SHR puisqu'elle présente moins de risque d'hypertension. Par ailleurs, la consanguinité de ces rats fait en sorte qu'ils ont du sang homologue pouvant être transfusé de l'un à l'autre sans provoquer de complications. De plus, l'étude a été conduite chez des mâles pour éviter l'ajout d'un facteur confondant (sexe) compte tenu de la petite taille de l'échantillon expérimental. Le poids des animaux, quant à lui, a été décidé pour optimiser la qualité des procédures expérimentales. Effectivement, plus le rat est gros, plus il est facile de procéder à l'intervention chirurgicale nécessaire pour effectuer la transfusion. Toutefois, puisque l'estimation du débit cardiaque se fait en utilisant

l'échographie, la taille des animaux a dû être limitée afin d'assurer une bonne pénétration acoustique et la cueillette d'images de qualité.

La présente section décrit comment le sang à transfuser a été prélevé chez le rat donneur et traité, en plus d'expliquer en détail la méthode originale de transfusion par échange du tiers du volume sanguin. La figure 8 présente le contenu de cette section sous forme de schéma.



**Figure 8: Schéma de la procédure pour la transfusion de sang par échange de globules rouges modifiés.**

Ce protocole expérimental a été élaboré en respectant les normes du Comité interne de la protection des animaux (CIPA) affilié au Conseil canadien de la protection des animaux (CCPA). Il a été accepté par le Comité d'éthique animal du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

## **RÉCOLTE DU VOLUME SANGUIN NÉCESSAIRE AU PROTOCOLE DE TRANSFUSION**

La récolte du sang à transfuser est une étape importante du protocole puisque ce sang, une fois traité, sera réintroduit dans un système vivant. La première étape sera donc de déterminer le volume de sang nécessaire à prélever pour réaliser le protocole. Nous expliquerons ensuite comment procéder à l'exsanguination d'un rat.

### **Détermination du volume de sang nécessaire**

Le volume sanguin total chez le rat peut être estimé en millilitres à 6 % de son poids en grammes (68). Puisque les rats utilisés dans notre protocole pesaient entre 275 g et 360 g, leur volume total de sang se situe entre 16.5 mL et 21.6 mL. Le volume de sang à transfuser pour échanger le tiers du volume sanguin de l'animal receveur est donc aux alentours de 5.5 mL à 7.2 mL. Il faut toutefois considérer qu'une partie du sang sera perdue au cours du protocole, soit lors des procédés de traitement des globules rouges, soit comme volume mort dans le circuit de transfusion. Nous en avons conclu, après quelques expériences, qu'un ratio de 2.5 : 1 rat est nécessaire pour obtenir la quantité suffisante de sang pour ce protocole.

### ***La collecte de sang***

L'exsanguination a été l'étape permettant d'aller chercher la quantité de sang nécessaire pour la transfusion d'un autre rat. L'élément majeur à considérer à cette étape a été la coagulation. Lorsque le sang est exposé à l'air ou en contact avec un matériel non biologique (par exemple le plastique), il forme habituellement des caillots (50). Lors du prélèvement sanguin, certains points ont dû être observés de façon rigoureuse pour éviter la formation de ces caillots ou la destruction des érythrocytes. Par exemple, il a fallu éviter d'appliquer une trop grande pression

négative avec la seringue au moment du prélèvement pour ne pas provoquer l'hémolyse des globules rouges.

### ***L'anticoagulant***

Le citrate de dextrose a été utilisé pour empêcher la coagulation. La seringue de 10 mL et le papillon de 25G ont été rincés avec l'anticoagulant, et une dose volumique de 1 : 9 de citrate de dextrose a été distribuée dans chacun des tubes de prélèvements. Le volume d'anticoagulant ajouté au sang l'a dilué à 88 % de sa concentration originale, a ajouté 18 meq de sodium, 3 meq de phosphate, et a altéré le pH de 7 à 7.2 (69).

De façon générale et plus commune, une exsanguination chez le rat s'effectue par la méthode de la ponction cardiaque. Cette méthode ne nécessite pas d'incision chez l'animal. Elle consiste plus spécifiquement en l'insertion habile de l'aiguille d'une seringue dans le ventricule gauche du cœur et de la ponction du volume de sang maximal à récolter. Une personne expérimentée peut donc, grâce à la palpation de l'abdomen du rat, déterminer l'endroit exact où insérer l'aiguille. Un guidage par échographie est aussi possible, si nécessaire. Les lésions du tissu cardiaque faites par l'aiguille et le contact de la matière avec le sang provoquent inévitablement la coagulation sanguine. Dans le souci de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons donc opté pour une méthode plus efficace, soit une exsanguination par l'aorte abdominale, nous permettant d'aller chercher un plus grand volume sanguin.

### **Exsanguination du rat par l'aorte abdominale**

#### ***Préparation de l'animal***

Une fois le matériel réuni, un rat a été anesthésié à une dose d'induction de 4 % d'isoflurane et de 2 % pour le maintien (procédure normalisée de

fonctionnement (PNF) numéro SA-49 du CHUM). La profondeur de l'anesthésie a été évaluée en testant les réflexes de l'animal. Le rat s'est par la suite fait raser l'abdomen et des passages à la chlorexidine et à l'alcool ont été effectués pour s'assurer de la stérilité. Le reste de la manipulation a été effectué de façon stérile par les méthodes de chirurgie aseptique.

### ***Procédure***

Pour atteindre l'aorte abdominale, la paroi de l'abdomen a été ouverte à l'aide d'un scalpel ou de ciseaux, et les organes internes exposés ont été déposés sur une gaze imbibée de saline physiologique pour en éviter l'assèchement et une réponse immunitaire pouvant modifier la composition du sang.

Une fois l'aorte abdominale apparente, elle a été dégagée et isolée à l'aide d'un coton-tige. Puis, la seringue et le papillon ont été rincés avec de la saline physiologique pour éviter une surdose d'anticoagulant. Le papillon a été inséré dans le vaisseau en s'aidant des pinces à dents de souris pour surélever l'aorte. Lors de cette procédure, il a été important de porter une attention particulière à la pression appliquée lors du prélèvement, une pression trop élevée aurait provoqué l'hémolyse des globules rouges. Une fois le sang prélevé dans la seringue, il a été déposé dans les tubes contenant une dose d'anticoagulant et a été mélangé par inversion.

### ***Précision éthique***

L'exsanguination par voie intra aorte abdominale a été une procédure terminale et a provoqué la mort de l'animal. Toutefois, si l'animal avait toujours été vivant suite à la procédure, nous nous serions fait un devoir (par soucis d'éthique) d'euthanasier ce dernier de façon adéquate pour minimiser ses souffrances par dislocation de la colonne dorsale.

## **TRAITEMENT DES GLOBULES ROUGES**

Une fois qu'un échantillon de sang assez volumineux a été récolté, il doit être traité pour déposer un revêtement polymérique à la paroi des globules rouges de façon à augmenter leurs propriétés agrégeantes. Cette méthode a été développée par Armstrong et al. (70).

La préparation du sang contrôle s'est faite en parallèle de celle du sang hyperagrégeant. Les étapes de préparation ont été exactement les mêmes; à la seule différence que le copolymère utilisé avait un poids moléculaire différent, ce qui implique que les globules rouges revêtus n'agrégeaient pas en micelles à la température physiologique. Pour s'assurer de la biocompatibilité de cette procédure, Baskurt et al. (65) ont vérifié que l'injection des polymères libres dans la circulation sanguine ne causait pas d'effets secondaires et que le revêtement de polymères à la membrane des globules rouges ne modifiait pas la viscosité plasmatique du sang. La conformation microscopique des globules rouges a également été vérifiée et aucun effet notable sur la membrane n'a été observé.

Il est important de préciser ici que toutes les manipulations de la présente étape ont été faites sous la flamme à l'aide d'un brûleur Benson afin d'éviter la contamination du sang à transfuser. Travailler sous la hotte aurait été tout aussi efficace.

### **Filtration du sang**

Le sang a été transfusé chez un rat homologue et la présence de caillots microscopiques aurait pu provoquer des complications aussi sévères qu'une embolie pulmonaire. Nous avons donc ajouté une étape de filtration du sang (filtre standard sanguin de 170 à 260 microns, Baxter) au début du protocole qui nous a assuré de ne

pas observer de pétéchies ou de détresse respiratoire chez l'animal lors du suivi postopératoire.

### **Le Marquage en fluorescence**

Afin de suivre de façon qualitative la clairance des érythrocytes modifiés suite à la transfusion, les globules rouges ayant eu un revêtement de copolymères ont aussi été marqués en fluorescence.

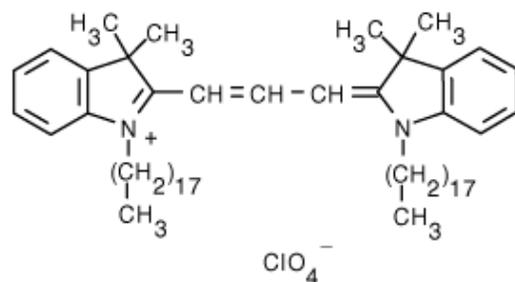
#### *Séparation des phases et lavages des érythrocytes*

Le sang filtré a premièrement été séparé par centrifugation à 1750 g pendant 10 minutes. Le plasma a ensuite été conservé à 4 °C et les globules rouges ont été resuspendus dans le tampon HEPES chaud; un tampon HEPES 20 mM qui a été utilisé pour les étapes de revêtement en polymère des érythrocytes (HEPES 20 mM, NaCl 130 mM, KCl 4 mM, D-glucose 5 mM, NaOH 13 mM et Pluronic F98 1%). Le pH du tampon a été ajusté à 7.50 et ce dernier a été préchauffé à 37 °C avant d'être utilisé. Les globules rouges ont été lavés trois fois pendant 6 minutes à 1400 g, puis dilués à 10 % d'hématocrite dans le tampon HEPES. La solution de globules rouges a ensuite été séparée en aliquotes de 20 mL et transférée dans un bain brasseur à 37 °C.

#### *Le marqueur fluorescent*

Le marqueur utilisé était le Vybrant DiI (figure 9). Il devient fluorescent lorsqu'incorporé dans les membranes cellulaires (un rouge-orange fluorescent avec une absorption maximale ( $Abs_{max}$ )  $\approx$  549 nm et une émission maximale ( $Em_{max}$ )  $\approx$  565 nm). Ce marqueur est immunogénique ou antigénique. Cette caractéristique est importante non pas au niveau du rejet de la transfusion, puisqu'il est peu probable

qu'il y ait une réaction anaphylactique suite à une transfusion unique, mais plutôt pour éviter de modifier la composition du plasma sanguin. Le plasma sanguin et la concentration en leucocytes modifient les forces d'agrégation érythrocytaire ainsi que la viscosité plasmatique. Il est disponible chez Invitrogen, au numéro de produit V22885 ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).



**Figure 9 : Structure moléculaire du Vybrant DiI.**

### ***Précaution***

Afin d'assurer un marquage uniforme des érythrocytes, les cellules ne devaient pas avoir été, à priori, exposées à un tampon polyvalent (c.-à-d., phosphate) pour ne pas entraîner la micellisation ou l'agglutination du marqueur. Aussi, les globules rouges devaient absolument être marqués en fluorescence avant tout autre recouvrement, tel Pluronic, pour ne pas endommager le revêtement lors du marquage.

### ***Le marquage en fluorescence***

Le marqueur fluorescent a été préparé en solution de 4  $\mu\text{M}$  en ajoutant 80  $\mu\text{L}$  de Vybrant DiI à 20 mL de tampon HEPES chaud. Le mélange a dû être inversé deux fois et immédiatement ajouté à 20 mL de la suspension 10 % de globules rouges. Faire le contraire, soit ajouter la suspension de globules rouges à la solution de marquage aurait entraîné un marquage inégal des cellules. Le tube a ensuite été

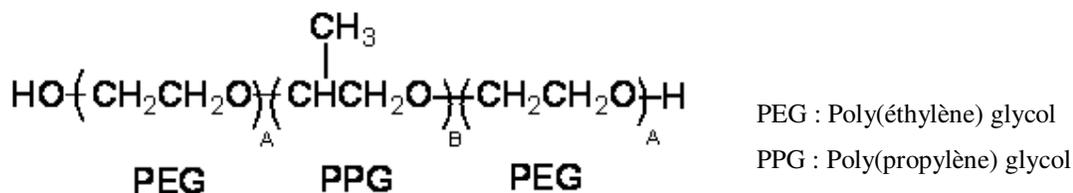
inversé deux fois et incubé dans un bain brasseur à 37 °C pour une heure à la noirceur. Dix millilitres d'albumine (provenant de sérum bovin (BSA)) 0.25 % dans l'HEPES ont ensuite été ajoutés à chaque tube de 40 mL pour retirer le surplus de marqueurs en solution en centrifugeant à 400 g pendant 10 minutes. Un premier lavage à 400 g pendant 10 minutes a été effectué avec un mélange 50 % HEPES/triethanolamine, puis un deuxième lavage au tampon triethanolamine a permis d'éliminer les traces d'HEPES, avant de resuspendre les globules rouges à 10 % d'hématocrite dans le triethanolamine 15 mM. (La préparation de triethanolamine en poudre à mélanger dans un litre d'eau distillée nous a été gracieusement fournie par le Dr Armstrong du département de physiologie et de biophysique de l'Université de la Californie du Sud (Los Angeles, Californie, États-Unis).) Dans un litre de ce tampon, on retrouvait 2.79 g d'hydrochloride de triethanolamine, 1.35 g de D-glucose, 0.30 g de KCl, 7.02 g de NaCl, 0.50 g de NaOH et 10 g de « Pluronic » F98 (poloxamer 188), le tout à 290 mOsm/kg et un pH de 8-8.4.

### **Le revêtement de polymères à la membrane des globules rouges**

La procédure ci-dessous décrit une méthode de revêtement membranaire des globules rouges permettant d'augmenter ou de prévenir l'agrégation érythrocytaire. Il est important de noter que cette méthode modifie l'agrégation des globules rouges via la formation de micelles (dans le cas du copolymère F98) ou l'absence d'adhésion (pour le copolymère contrôle F68), due à l'association ou la non-association des polymères entre eux. Ces effets sont possibles en raison des propriétés physico-chimiques des polymères. En effet, en solution aqueuse (ex. : le sang), les molécules tendent à s'organiser de façon à optimiser leurs liaisons d'un point de vue énergétique. En ce sens, les charges moléculaires s'organisent de façon à exposer leurs segments polaires au solvant, l'eau, et à regrouper leurs parties hydrophobes.

### *Les polymères*

Le polymère agrégeant est le « Pluronic » F98 et le polymère non agrégeant est le « Pluronic » F68. Tous deux ont une structure formée d'un centre de poly(propylène) glycol (PPG) flanqué de deux chaînes de poly(éthylène) glycol (PEG), tel que représenté à la figure 10 (71). Il existe un rapport de 80 : 20 entre les poids moléculaires des chaînes A et B décrites sur cette figure. C'est le poids moléculaire total du « Pluronic » qui déterminera ses propriétés d'agrégation une fois attaché à la membrane. Le « Pluronic » devra être activé par le succinimidyl carbonate (réaction d'activation) préalablement au traitement membranaire, de façon à faciliter son attachement aux résidus lysines des protéines membranaires. Le F98-succinimidyl carbonate (13000 g/mol) forme des micelles à la température physiologique, alors que le succinimidyl carbonate F68 (8400 g/mol) n'aura pas cette tendance à stabiliser les liaisons intermoléculaires en adoptant cette structure (71).

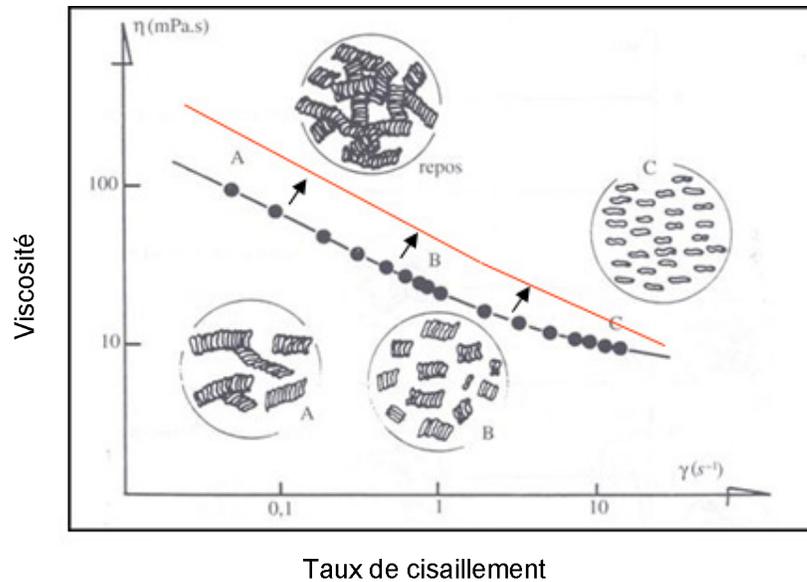


**Figure 10 : Structure chimique d'un « Pluronic » et son bloc de copolymère (reproduit de (70)).**

### *Effet du traitement agrégeant sur la viscosité sanguine*

Selon les expériences effectuées par nos collaborateurs (70) sur des érythrocytes humains, une concentration de « Pluronic » F98 hyperagrégeant de 0.25 mg/mL de sang entraîne une augmentation de la viscosité à bas cisaillement d'environ trois fois les valeurs observées avec le copolymère contrôle (F68). La courbe rouge de la figure 11 représente la conséquence que le traitement hyperagrégeant aura par rapport au contrôle dans des conditions physiologiques. Nous illustrons donc visuellement que l'augmentation de l'hyperagrégeation déplace

en théorie la courbe de viscosité en fonction des taux de cisaillement vers la droite, tel que démontré par Armstrong et al. (70).



**Figure 11: Impact du traitement agrégeant sur la courbe de viscosité en fonction du taux de cisaillement.**

### *Précaution*

Dans le but d'obtenir un revêtement uniforme des globules rouges, la procédure réactionnelle s'est déroulée dans une chambre froide maintenue à 4 °C. Cette température se trouvait en dessous de la température de micellisation des polymères et assurait que la chaîne de polymères reste dans sa structure linéaire plutôt que sous sa forme de micelles. Le non-respect de cette consigne aurait pu causer des réactions croisées entre les globules rouges, ce qui se serait soldé en l'agglutination permanente des érythrocytes et aurait rendu l'échantillon sanguin inutilisable.

### ***Procédure***

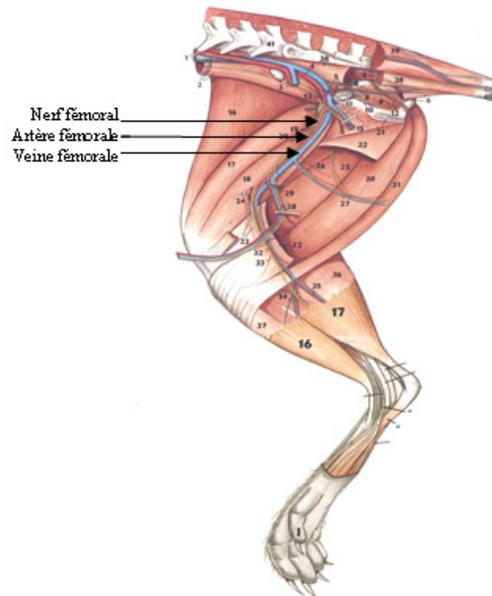
La procédure de revêtement membranaire est faite suite à la dernière étape du marquage, soit la suspension des globules rouges à un hématocrite de 10 % dans le triethanolamine. Le protocole a été décrit pour des aliquotes de 10 mL de suspension d'érythrocytes. La procédure pour le F98 a été identique à celle réalisée pour le F68.

La solution stock de F98-SC (F98-succinimidyl carbonate) comprenait 10 mg du polymère, auxquels ont été ajoutés 1 mL de solution HCl/saline 10 mM dans un tube de 2 mL. Le tube a vigoureusement été brassé manuellement jusqu'à dissolution du polymère, ce qui a donné une solution de 10 mg/mL. Un quart de mL de cette solution a ensuite été déposé dans un tube de 50 mL, dans lequel a été ajouté 10 mL de la suspension de globules rouges à un hématocrite de 10 %. Il était important de mixer immédiatement pour assurer un revêtement uniforme. La suspension finale était de 0.25 mg/mL. Une incubation et une oscillation constante d'une à deux heures à 4 °C a permis à la réaction d'être complète. Le volume du tube a ensuite été complété avec de la saline physiologique. Trois lavages de 5 minutes à 400 g ont permis de se débarrasser des résidus réactionnels. Les érythrocytes ont ensuite été resuspendus dans leur plasma autologue (conservé à 4 °C) et l'hématocrite a été ajusté à 40 %.

### **PROCÉDURE DE TRANSFUSION**

Avant d'appliquer la procédure de transfusion chez le rat, des mesures physiologiques préchirurgicales, décrites plus bas, ont été prises afin d'établir nos valeurs de référence. L'utilisation d'un microscope chirurgical était recommandée pour faciliter la transfusion (l'ordre de grandeur des structures considérées est de l'échelle du micromètre). Les étapes devaient se dérouler selon les recommandations d'une chirurgie aseptique. Le sang, lors de la transfusion, devait être maintenu à 37 °C dans un bain-marie, pour ne pas provoquer d'hypothermie chez l'animal. La

veine fémorale gauche et l'artère fémorale droite ont été utilisées respectivement pour l'injection du sang et le retrait. La figure 12 situe les vaisseaux canulés dans la patte arrière d'un rat.



**Figure 12 : Anatomie de la patte arrière d'un rat.**

Cette procédure de transfusion par échange n'entre pas dans la catégorie des transfusions de masse puisqu'elle ne correspond pas à un échange de plus de 50 % du volume sanguin total dans un délai de 12 à 24 heures. Toutefois, puisque le tiers du volume a été échangé dans un laps de temps approximatif de 10 minutes, plusieurs considérations importantes ont dû être observées pour éviter les complications hémostatiques et métaboliques. Le maintien du volume sanguin tout au long de la procédure permettait de garder une stabilité physiologique, puisqu'il prévenait les changements de pression subite. La température devait quant à elle rester aux alentours du 37 °C. Nous avons obtenu la permission du comité éthique de ne pas mesurer la pression et la température au cours de l'intervention, à condition de retirer et injecter le sang préchauffé de façon simultanée.

### *Complications possibles*

Puisque le sang transfusé était anticoagulé, il aurait été possible que l'animal entre en alcalose métabolique ou qu'il y ait une chute de son niveau de calcium ionisé si l'infusion du citrate de dextrose était accumulée (73). Lors de l'élaboration du protocole et à la suite de certaines complications observées lors des préexpérimentations que nous soupçonnions être dues à un excès d'anticoagulant, nous avons jugé pertinent d'exécuter une transfusion de sang homologue anticoagulé, dans une animalerie où l'équipement pour doser le calcium ionisé était disponible. Nos doses de citrate de dextrose utilisées ont été testées de façon à s'assurer que le calcium ionisé sanguin gardait un niveau physiologique sans danger pour l'animal. Lors de tout le processus de développement de la méthode, un seul rat n'a pas survécu à la transfusion et s'est trouvé en détresse respiratoire au réveil, ce que nous avons attribué à une occlusion du lit pulmonaire dû à un microcaillot qui n'avait pas été filtré adéquatement.

Nous avons donc transfusé deux rats (avec du sang homologue et non modifié) pour analyser le calcium ionisé (Bayer Diagnostics 348) avant et après la transfusion sanguine. Un rat ayant vécu dans le même environnement que les rats transfusés a servi de contrôle. Une goutte de sang a été prélevée de la queue de chaque rat. La valeur de calcium calculée a été ajustée par rapport aux valeurs du pH sanguin. L'appareil utilisé a ensuite validé automatiquement que l'échantillon sanguin respectait les valeurs physiologiques chez le rat. Tel qu'indiqué au tableau 1 ci-dessous, la transfusion ne semblait pas débalancer le calcium ionisé, ce qui nous a permis de ne pas nous inquiéter de potentielles répercussions hémorragiques.

Rat	pH pré transfusion	Ca <sup>2+</sup> ionisé pré transfusion (mmol/L)	pH post transfusion	Ca <sup>2+</sup> ionisé post transfusion (mmol/L)
1	7,361	1,21	7,366	1,28
2	7,424	1,24	7,412	1,23
Contrôle non transfusé	7,381	1,32	7,412	1,30

**Tableau 1 : Comparaison du taux de calcium ionisé avant et après la procédure de transfusion sanguine (n = 3 rats).**

## **Préparation de l'animal à transfuser**

L'animal à transfuser a reçu une dose de 200 mg/kg de Tylenol en sirop administré par gavage pour diminuer ses souffrances au réveil. L'anesthésie à l'isoflurane a été induite à une dose de 4 % et maintenue à 2 % pour le restant de la procédure. Le rat a ensuite été installé sur un tapis chauffant pour éviter la chute de sa température physiologique. Trois millilitres de saline de dextrose 2.5 % ont été administrés de façon sous-cutanée au niveau de l'abdomen pour tamponner l'équilibre hémostatique (maintien des concentrations d'électrolytes physiologiques). De l'onguent ophtalmique (lubrifiant oculaire/pommade ophtalmique, Allergan Refresh®) a été appliqué sur les yeux pour éviter l'assèchement de la cornée lors de l'anesthésie au gaz. Le rat a été rasé au niveau des pattes postérieures pour exposer la région des vaisseaux fémoraux. Les sites chirurgicaux ont été infiltrés à la marcaïne 0.25 % (bupivacaïne hydrochloride) pour une dose de 2 mg/kg divisée en deux volumes administrés de façon sous-cutanée dans chacune des pattes postérieures. Les régions d'interventions ont finalement été nettoyées à la chlorexidine diluée. Trois passages d'alcool/chlorexidine dilué ont précédé le transfert du rat sur le piqué chirurgical pour désinfecter la peau. Le dernier passage a été effectué sur le piqué.

## **Procédure chirurgicale**

Toutes les étapes de la chirurgie se déroulent de façon stérile.

### ***Exposition de la veine fémorale gauche***

Une incision d'un centimètre a été faite avec une lame de scalpel (Sklar Instruments, Surgical Blades 15T No. 3) sur la peau de la patte gauche au niveau de l'aîne dans l'axe de la veine fémorale. Une fois l'incision faite, une dissection

mousse a été effectuée pour dégager les vaisseaux du tissu conjonctif. Un écarteur permettait de garder le site exposé.

### ***Isolement du vaisseau***

Il était important de dégager la veine de l'artère en portant une attention particulière pour ne pas endommager le nerf, ce qui aurait pu entraîner la paralysie au niveau des pattes de l'animal. Une fois la veine isolée, une goutte de lidocaïne 2 % a été déposée sur le vaisseau pour éviter la contraction vasculaire qui aurait réduit son diamètre. De la soie 4-0 (ETHICON) a été utilisée pour faire une ligature proximale du vaisseau, sans toutefois nouer le fil. Une deuxième ligature (soie 4-0) a été faite légèrement en aval du point d'incision du cathéter. Ce dernier a été noué, et les surplus de fils ont servi à exercer une pression lors de l'insertion du cathéter. Les dimensions du cathéter utilisé était de 26G X 19 mm, le diamètre externe était de 0.6 mm et le diamètre interne est de 0.4 mm (Venisystems™, Abbocath®-T). Ce dernier, ainsi que le bouchon PRN (Baxter Interlink® Injection Site), a ensuite été rincé au citrate de dextrose puis à la saline physiologique pour éviter la coagulation, sans toutefois injecter une dose d'anticoagulant dans la circulation qui aurait pu diminuer la quantité de calcium ionisé sanguin nécessaire aux activités physiologiques.

### ***Insertion du cathéter***

Pour insérer le cathéter, il a fallu exercer une tension sur les deux ligatures : du côté distal avec une pince hémostatique immobilisée avec une aiguille 18G piquée sur la planche de mousse, du côté proximal en utilisant le poids d'un gros porte-aiguille. En bloquant la circulation et en soulevant la veine, le cathéter a facilement pu être introduit. Lorsque le cathéter a rencontré la ligature, il ne restait qu'à dénouer le fil pour pouvoir passer le cathéter. Il a fallu par la suite ligaturer le nœud proximal autour du cathéter inséré dans le vaisseau pour l'immobiliser et mettre le bouchon

PRN pour empêcher le sang de s'écouler. La veine était ensuite prête pour la transfusion.

### ***Procédure sur l'artère fémorale***

La procédure sur l'artère fémorale droite a été identique à celle utilisée pour la canulation de la veine fémorale gauche. Le sens du flot a automatiquement été respecté.

### ***Transfusion***

Le volume à échanger doit correspondre au tiers du volume total de l'animal afin de comparer nos résultats avec ceux de Baskurt et al. (65). Rappelons que le volume sanguin total équivaut en millilitres à environ 6 % du poids en g. Une seringue de 10 mL a été remplie du sang traité (ou contrôle selon le cas) et a été reliée à un tube ayant un adaptateur permettant de le visser au cathéter veineux. Une deuxième seringue a été remplie de citrate de dextrose et reliée à un cathéter artériel. Une pompe (Harvard Instruments) a été utilisée pour retirer et injecter simultanément le volume de sang. Un débit de 0.75 mL/min a été programmé. Nous avons déterminé le débit de la pompe en fonction des débits cardiaques observés lors de la mise au point du protocole. Puisque les valeurs de débit tournaient aux alentours de 750  $\mu$ L/min et que les fémorales sont des vaisseaux de calibre important, nous en avons conclu que ce flot serait adéquat pour notre procédure. Une fois le tiers du volume sanguin échangé, nous avons enlevé un cathéter à la fois et bien ligaturé les nœuds proximaux aux points d'insertion, afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de saignement et ainsi éviter les hémorragies. La transfusion a pris entre 6 et 7 minutes pour des animaux pesant près de 300 g et le temps variait selon le volume de sang calculé chez l'animal, puisque le débit de transfusion restait toujours le même.

### ***Suture des plaies***

Mentionnons que la ligature des vaisseaux ne présente pas de risque pour la perfusion des membres inférieurs. En effet, lors de la ligature de l'artère et de sa veine fémorale en situation de taux de cisaillement maintenu, entraîne la croissance de vaisseaux collatéraux restaurant la conductance complète du système vasculaire (72). La paroi musculaire des cuisses a ensuite été suturée avec de la soie 4-0 (ETHICON) avec des points matelas. La peau de l'aîne, quant à elle, a été refermée avec du vicryl 4-0 (ETHICON). Ces derniers points ont été faits en continu et des agrafes cutanées (Autoclip 9 mm, Clay, Adams® Brand) ont solidifié les plaies pour éviter que l'animal retire les points lui-même.

### **Réveil de l'animal**

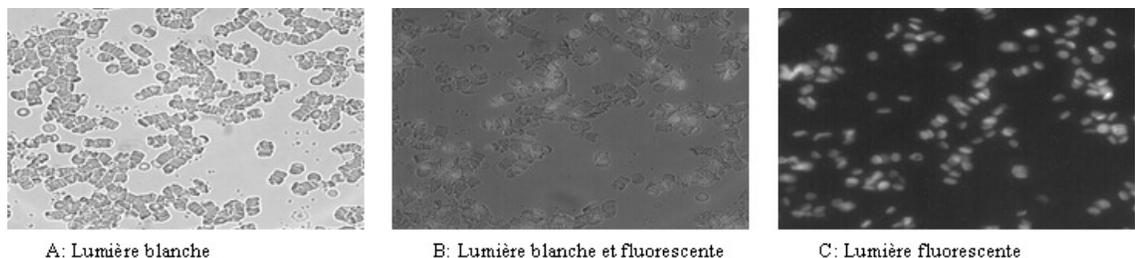
Une fois les plaies de l'animal bien refermées, l'anesthésie a été stoppée. L'animal a ensuite été installé dans une cage de réveil déposée sur un tapis chauffant. Des gâteries ont été déposées dans la cage pour stimuler son appétit. Il était important de surveiller l'éveil de l'animal pour s'assurer qu'il n'y ait pas de complications postchirurgicales par exemple de la détresse respiratoire. Une fois le reste de l'étude complétée, les animaux seront euthanasiés au dioxyde de carbone.

### **CONTRÔLE DE LA RÉUSSITE DE LA TRANSFUSION**

Pour s'assurer de la réussite de la transfusion, une observation qualitative de la fluorescence d'une goutte de sang a été faite à différents jours post transfusion sur les premiers rats servant à l'élaboration du protocole. Cette précaution nous a permis de conclure que notre méthode de transfusion mettait bel et bien les globules rouges modifiés en circulation chez l'animal.

## Observation de la fluorescence dans les échantillons sanguins

Il est important de vérifier que les globules transfusés sont bel et bien en circulation à la suite de la chirurgie. Tel que mentionné précédemment, c'est le marqueur fluorescent qui nous permet de faire le suivi qualitatif. Cette vérification est effectuée en coupant un petit bout de l'extrémité de la queue du rat. En trayant celle-ci, il est possible d'aller chercher quelques gouttes de sang pour une observation au microscope. Le Vybrant DiI permet d'observer les globules marqués qui apparaîtront de la couleur orange. La figure 13 permet d'avoir un aperçu du rapport qualitatif des globules marqués et des globules non marqués. Un prélèvement d'un échantillon sanguin après chaque étape d'observation de l'animal dans le temps, lors de la mise au point du protocole, nous a donné un indice de la quantité de globules rouges traités encore présents dans le système circulatoire. Dans notre cas, nous avons validé qu'il restait toujours des globules marqués jusqu'à plus d'un mois après la transfusion, bien qu'il soit visible que la quantité diminue cependant au fil du temps. En effet, des échantillons sanguins ont été observés à la suite des mesures échographiques. Il est toutefois difficile d'utiliser ces observations à des fins de comparaison quantitative puisque plusieurs facteurs influencent l'image obtenue (quantité de sang sur la lame, évaporation du plasma changeant l'hématocrite, ajustements microscopiques, etc.). La figure 13 est un exemple des images que nous obtenions selon trois éclairages. Pour un même échantillon de sang, il était possible d'observer une image de la totalité des globules rouges (A), de la totalité des globules en mettant en évidence les globules marqués (B) et de la fraction marquée des globules marqués seulement (C).



**Figure 13 : Observation d'un échantillon sanguin de rat ayant été transfusé avec du sang traité au F98 et marqué au Vybrant DiI. (Images à 15 jours posttransfusion).**

C'est donc l'observation qualitative du sang posttransfusion qui nous a rassurés quant à la fiabilité de la méthode de transfusion.

### ***SUIVI LONGITUDINAL DES VARIABLES CARDIOVASCULAIRES DES RATS TRANSFUSÉS***

Dans cette étude, dix rats (voir le tableau 2) ont été transfusés. La moitié des rats ont reçu du sang contrôle dont les globules rouges ont un revêtement de copolymères F68 inhibant l'agrégation érythrocytaire, alors que l'autre moitié ont été transfusés avec le sang hyperagrégant associé au copolymère F98. À la suite de la procédure de transfusion, le suivi longitudinal des animaux sur une période de 19 jours nous a permis de voir comment l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire influençait les paramètres cardiovasculaires (débit cardiaque et résistance périphérique).

Groupe	Rat	Poids (g)
F68	611	291
	612	289
	431	345
	421	334
	511	281
F98	621	286
	622	283
	451	338
	422	358
	512	275

**Tableau 2 : Numéro d'identification, et poids des rats dans les deux groupes. Poids 280-360 g.**

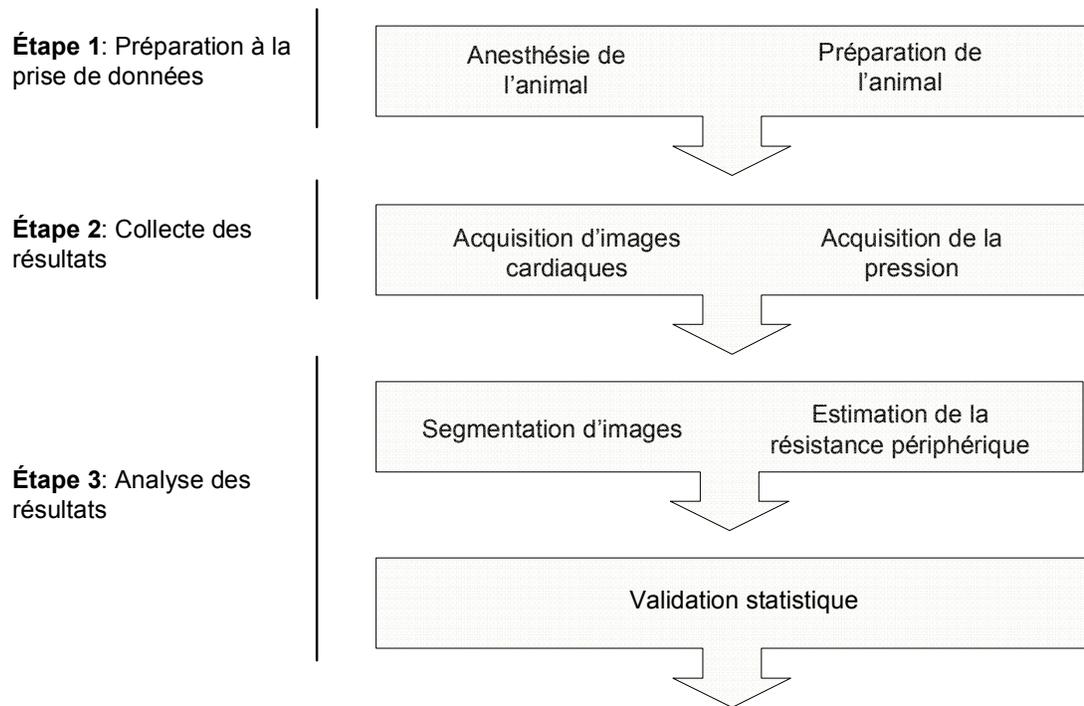
Parmi les paramètres mesurés, on retrouve le débit cardiaque et la pression systolique de la queue. Le rythme cardiaque, la fraction d'éjection et le volume systolique influençant le débit cardiaque ont aussi été observés. À partir des résultats

du débit et de la pression caudale systolique, une estimation de la résistance périphérique a ensuite été déduite. Les différentes mesures ont chacune été prises avant la transfusion, ainsi qu'aux jours un, deux, trois, six, 10, 15 et 19, à l'exception des rats 511 et 512 pour lesquels les données n'ont pas été comptabilisées aux jours deux, 15 et 19 pour cause de difficultés techniques avec les appareillages. Une table d'ANOVA à deux variables avec mesures répétées a été utilisée pour les comparaisons (SigmaStat, version 3.11, Systat Software, Richmond, CA, USA).

La présente section décrit donc le cheminement qui nous a permis d'observer les effets d'une augmentation de l'agrégation érythrocytaire par le moyen d'une transfusion par échange sur la pression artérielle moyenne. Les adaptations du débit cardiaque et de la résistance périphérique ont également été notées et permettront de vérifier notre hypothèse stipulant que les mécanismes de l'homéostasie réussissent à maintenir la pression artérielle moyenne constante. Nous nous attendons à ce que le réflexe des barorécepteurs, le retour veineux et les forces de cisaillement à la paroi vasculaire soient plus spécifiquement responsables des variations observées. Le présent protocole expérimental de suivi longitudinal respecte les normes du Comité interne de la protection des animaux (CIPA) affilié au Conseil canadien de la protection des animaux (CCPA). Il a été accepté par le Comité d'éthique du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Certains de ces rats seront utilisés suite à leur sacrifice pour les expériences vasculaires.

## **MÉTHODOLOGIE POUR LA COLLECTE DES RÉSULTATS**

La figure 14 est un diagramme des différentes étapes de la méthode, décrite plus en détail aux sections suivantes.



**Figure 14 : Schéma de la procédure pour le suivi longitudinal des variables hémodynamiques et cardiovasculaires.**

## **Préparation à la prise de données**

### *Anesthésie de l'animal*

L'animal à observer a d'abord été anesthésié dans une cage d'inhalation à une dose d'induction de 4 % et 2 % de maintien à l'isoflurane. Sa température corporelle a été maintenue à  $37 \pm 1$  °C. Le maintien de la température a été assuré par une plaque chauffante sous l'animal réglée à 42 °C, ainsi que par une lampe chauffante braquée sur l'animal.

### *Préparation de l'animal*

L'animal en décubitus dorsal avait les pattes fixées avec du ruban adhésif à la plaque chauffante qui servait également de capteur pour l'électrocardiogramme (ECG). Un gel conducteur permettait aux électrodes de capter l'ECG. La température

physiologique a été captée par une sonde rectale (THM100; Indus Instruments, Houston, TX). Un brassard pour l'évaluation de la pression caudale a été disposé à la base de la queue. La méthode d'acquisition de cette mesure sera décrite plus loin.

L'animal a ensuite été rasé et épilé avec une crème dépilatoire commerciale pour peau sensible au niveau de la cage thoracique. Cette étape de préparation était nécessaire afin d'obtenir une image échographique de qualité. Elle a ainsi permis d'éliminer toutes traces de poils qui auraient pu créer une couche d'air à la surface de la peau (l'air atténue les ultrasons). Une fois la peau bien nettoyée de façon à éviter les brûlures chimiques, l'animal était prêt pour l'acquisition des données.

## **Collecte des résultats**

### ***Acquisition d'images échographiques cardiaques en coupe longitudinale***

Nous avons mesuré le rythme cardiaque, le volume systolique, la fraction d'éjection et le débit cardiaque par imagerie du ventricule gauche à l'aide d'un biomicroscope ultrasonore (Vevo 770, Visualsonics, Toronto, Canada) équipé d'une sonde à 25 MHz (sonde 710). Un gel d'échographie (Aquasonic 100; Parker Laboratories, Orange, NJ) déposé sur le corps de l'animal permet d'obtenir une transmission acoustique adéquate.

Une coupe longitudinale en grand axe a été choisie pour l'acquisition d'images mode B sur quelques cycles cardiaques. Le mode B permet d'imager la structure du cœur en tons de gris. Il était important de s'assurer que l'image à analyser était bien au focus pour faciliter l'analyse et améliorer la qualité des résultats. La respiration, le rythme cardiaque et l'ECG sont simultanément enregistrés. Puisqu'un ECG de l'animal est dessiné en simultané sur l'écran de l'échographe, il est possible de synchroniser l'image acquise par rapport à la systole et la diastole. C'est le « VisualSonics Cardiac Measurement Package » (version 13)

qui identifie automatiquement les étapes du cycle cardiaque, bien que celles-ci puissent être observées qualitativement en décortiquant la progression de l'ECG.

### ***Acquisition de la pression systolique sur la queue de l'animal***

Nous avons utilisé la méthode non invasive du « tail-cuff » (XBP-1000; Kent Scientific, Torrington, CT) pour évaluer la pression systolique caudale du rat en s'assurant que les conditions expérimentales, particulièrement la profondeur de l'anesthésie et la température de l'animal, soient les plus constantes possible. Il a été démontré que cette valeur de pression systolique au niveau de la queue corrélait bien avec les valeurs de pression artérielle moyenne de l'animal (74).

Nous tenons toutefois à rappeler qu'il est attendu d'obtenir des fluctuations dans les résultats de pression artérielle moyenne puisque c'est une valeur qui tend toujours vers un équilibre et qui fluctue selon le rythme circadien. L'activité physique, le stress, la posture, le système nerveux autonome et le profil endocrinien sont des exemples de facteurs modifiant la pression (75). Cet équilibre est constamment déplacé à l'intérieur d'une fenêtre de valeurs acceptées par le système homéostatique, tel que discuté dans le chapitre un. Évidemment, puisque l'animal se trouve sous anesthésie, la pression est moins élevée que lorsqu'il est conscient. Chaque valeur de pression a été enregistrée en triplicata après chacune des acquisitions d'images mode B du ventricule gauche pour être ensuite moyennée et notée.

### **Analyse des résultats**

#### ***Segmentation des images cardiaques***

La segmentation manuelle du contour du ventricule gauche permet d'estimer l'aire de celui-ci. Le Vevo 770 a été programmé pour pouvoir en déduire le volume

d'éjection systolique, par le produit de la fraction d'éjection et du volume systolique. Une fois que le programme connaît les volumes pour les différents moments d'un cycle cardiaque, il peut donc estimer le débit cardiaque et nous en donner une valeur en mL/min. Le volume en fonction de l'aire du ventricule

$$V = 0.85 (A^2)/L$$

où V est le volume, A l'aire du ventricule gauche et L la longueur du ventricule (voir annexe 1) (76). La figure 15 présente un exemple d'image type du ventricule gauche d'un cœur de rat en coupe longitudinale dont le contour a été segmenté.

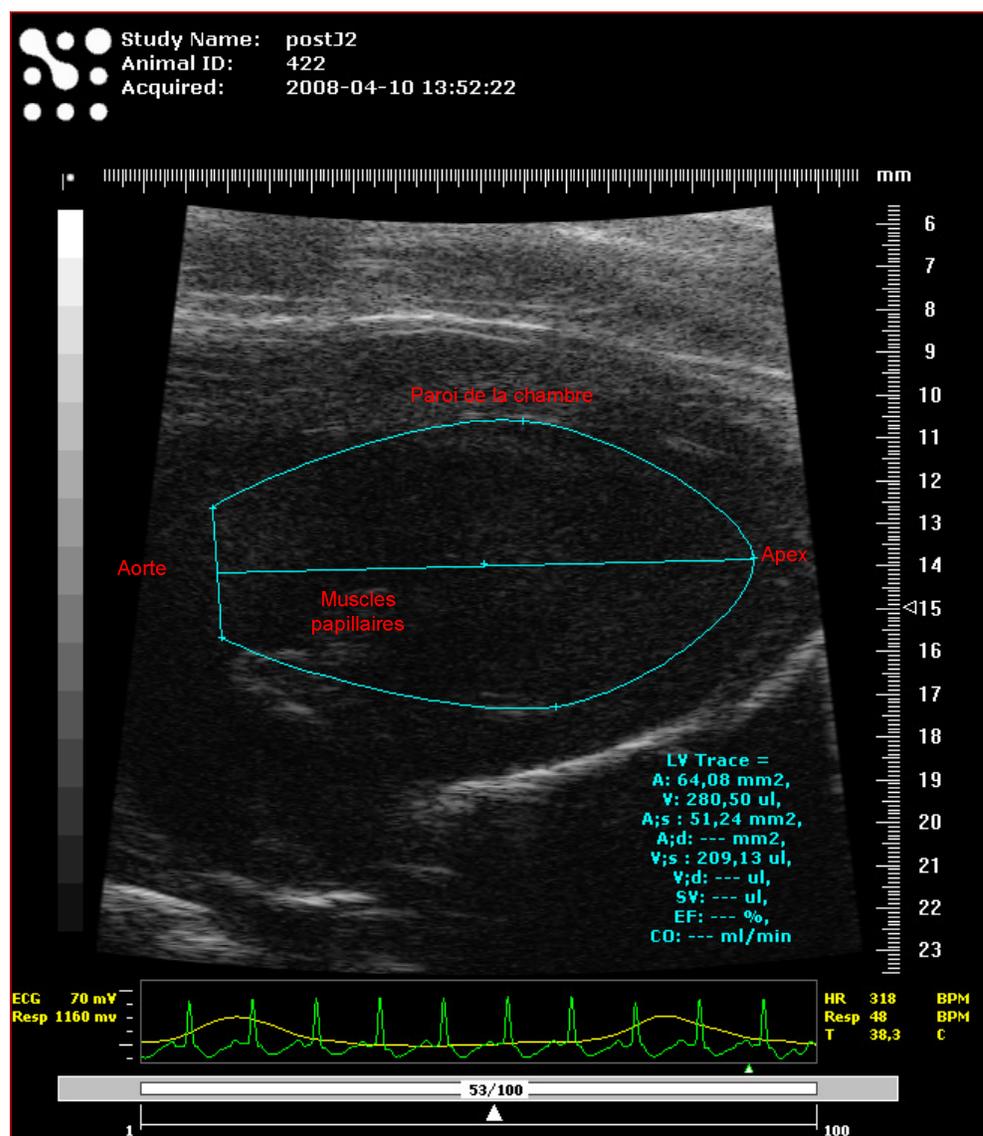


Figure 15 : Segmentation en mode B d'une image type du ventricule gauche en coupe longitudinale d'un cœur de rat.

La segmentation se fait sur 30 images, soit approximativement trois cycles cardiaques. Cette étape permet de déterminer le volume systolique, la fraction d'éjection et le débit. La qualité d'acquisition des images a été évaluée visuellement et visait à garder les structures du ventricule dans le plan de la sonde échographique afin de tracer un contour reproductible. Un bras mécanique est disponible pour maintenir la sonde en place lors de l'acquisition d'images, mais la précision des mouvements s'en trouve de beaucoup limitée. La qualité des images est donc nettement supérieure lorsqu'elles sont enregistrées à main libre par une personne expérimentée. Tel qu'indiqué à la figure 15, les structures importantes d'identifier sont les muscles papillaires, le début de l'aorte et l'apex du cœur.

#### *Estimation de la résistance périphérique*

Tel que mentionné dans la revue de la littérature, la pression découle du produit de la résistance périphérique et du débit cardiaque. Nous avons donc estimé la résistance périphérique à l'aide d'une règle de trois, soit en divisant la pression systolique de la queue par le débit estimé par segmentation d'images.

Le chapitre suivant présentera le suivi longitudinal du débit cardiaque, du rythme cardiaque, de la fraction d'éjection, du volume d'éjection systolique, de la pression systolique de la queue et d'une estimation de la résistance périphérique à l'écoulement sanguin.

### ***ÉVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE DES ARTÉRIOLES MÉSÉNTÉRIQUES***

L'évaluation de la fonction endothéliale, à la suite du sacrifice des animaux transfusés, nous donnera un indice à savoir si l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire a laissé des séquelles vasculaires chez les rats. Rappelons qu'après le

quatrième jour posttransfusion, l'équipe de Baskurt et al. (65) avait remarqué une dysfonction endothéliale chez leurs rats. Aucune évaluation n'a été faite ultérieurement puisque tous leurs rats avaient été sacrifiés après quatre jours.

Puisque la dysfonction endothéliale est normalement accompagnée de remodelage vasculaire, soit la destruction de cellules endothéliales, la prolifération du muscle vasculaire lisse et/ou la synthèse de matrice extracellulaire, il devrait être possible d'observer des différences entre le groupe traité au sang hyperagrégant et le groupe contrôle si dommage il y a (77, 78). Dans le cas contraire, nous pourrions supposer que les mécanismes homéostatiques ont réussi à tamponner les effets hyperagrégant de notre transfusion sanguine, ce qui irait dans le même sens que notre hypothèse. Rappelons tout de même que tel que présenté au chapitre 3, la pression avait réussi à être maintenue à des valeurs physiologiques, bien que des adaptations cardiaques aient été notées aux jours 1 à 3. En ce sens, il serait probable que des adaptations vasculaires ayant modifié le phénotype des vaisseaux aient compensé la perturbation du flot causée par l'hyperaggrégation pour maintenir la pression.

Comme cette étude est exploratoire, nous avons opté de comparer les fonctions endothéliales à différents moments, d'abord à un mois, ensuite à plus long terme, soit à six et huit mois. Si des différences sont à observer entre nos deux groupes, le protocole nous donnera un indice quant à savoir si celles-ci sont dépendantes ou non de l'endothélium. Si les réponses vasculaires sont modifiées, nous pourrions soupçonner du remodelage des microvaisseaux à long terme lorsque ceux-ci sont exposés à du sang hyperagrégant.

Le tableau 3 identifie les rats traités au sang hyperagrégant et contrôle ainsi que le temps post transfusion au sacrifice.

Groupe	Rat	Délais avant sacrifice post transfusion
F-68	611	1 mois
	612	
	711	
F-98	621	
	622	
	721	
	722	
F-68	421	6 mois
	511	
F-98	422	
	512	
F-68	431	8 mois
F-98	451	

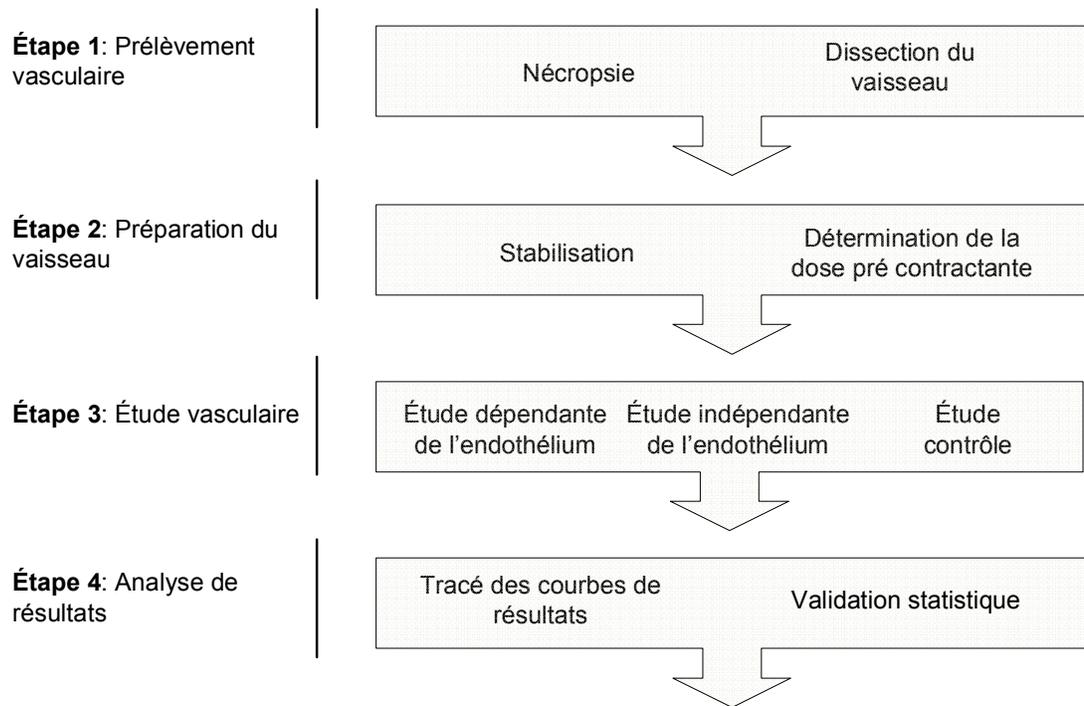
**Tableau 3 : Délais de sacrifice des rats suite à la transfusion.**

Nous décrivons d'abord l'utilité d'une courbe dose-réponse, ensuite la procédure de prélèvement du mésentère de rat suite à l'euthanasie et les étapes d'évaluation de la fonction endothéliale. Pour finir, nous présenterons les résultats et nous en discuterons.

Sachez que tous les animaux ont été sacrifiés au CO<sub>2</sub>. La procédure d'euthanasie respecte les normes du Comité interne de la protection des animaux (CIPA) affilié au Conseil canadien de la protection des animaux (CCPA).

### **PROCÉDURE D'ÉVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE**

La procédure vasculaire se divise en quatre étapes. Premièrement, le rat doit être sacrifié de façon éthique dans une chambre remplie au dioxyde de carbone. Les étapes suivantes sont illustrées à la figure 16 et seront ensuite décrites.



**Figure 16 : Schéma de la procédure pour l'évaluation de la fonction endothéliale.**

### **Prélèvement vasculaire**

Le décès de l'animal a été constaté en observant l'absence du réflexe de la rétine, de la respiration, du rythme cardiaque et de la réaction au pincement d'une patte. Suite au décès, nous avons procédé à la nécropsie et à la dissection du vaisseau.

### ***Nécropsie***

La première étape a été de placer le rat en décubitus dorsal et de mouiller les poils de son ventre pour éviter qu'ils ne collent aux ciseaux. Il a fallu commencer par découper la peau d'une incision partant du bas du ventre jusqu'à la cage thoracique. Il était ensuite plus facile de découper le muscle de la même façon. Pour éviter que les organes s'assèchent, ils ont été maintenus humides à l'aide du tampon Krebs refroidi sur glace (NaCl 118 mM, KCl 4.65 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.18 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18

mM, CaCl<sub>2</sub> 2.50 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, D-glucose 5.5 mM, EDTA 0.026 mM). Le mésentère a été prélevé en coupant le tube digestif le plus près de ses extrémités. Ensuite, les intestins et le mésentère ont été conservés dans le milieu physiologique (tampon Krebs) sur glace jusqu'à l'étape suivante.

### ***Dissection du vaisseau***

Pour chaque rat à l'étude, un vaisseau de quatrième ordre d'un diamètre de 200-275 µm a été disséqué et utilisé pour l'évaluation des paramètres microvasculaires. Pour ce faire, une portion de l'intestin prélevé a été étendue sur un piqué de travail à l'aide d'aiguilles de façon à exposer les vaisseaux du mésentère. Le milieu physiologique froid devait immerger l'organe pour maintenir les cellules en vie. Au microscope chirurgical, un vaisseau a été choisi et dénudé des tissus adipeux. Cette étape était cruciale pour la survie du vaisseau. Le stress de la dissection a dû être appliqué de façon parallèle au vaisseau sans quoi le tissu vasculaire aurait été endommagé et n'aurait pas répondu aux agents pharmacologiques. Une fois le vaisseau mis à nu, il a été coupé en ses extrémités en gardant une partie de gras ou d'embranchement de l'un des deux côtés pour se rappeler la direction du flot sanguin.

### **Préparation du vaisseau**

Suite à la dissection et l'extraction de l'artériole, celle-ci a été montée sur des micropipettes d'un diamètre comparable à celui du vaisseau dans un bain d'organe (Living Systems Instrumentations, modèle V94, Burlington, États-Unis). Le montage expérimental a dû être assemblé de façon cohérente à l'écoulement du flot sanguin, ce qui signifie que le côté de la pompe et du transducteur de pression devait être le côté en amont du flot.

### ***Stabilisation en milieu physiologique***

Le milieu physiologique utilisé pour l'expérience était le tampon Krebs décrit plus haut. Le milieu était maintenu à 37 °C par un échangeur de chaleur et était oxygéné par un mélange gazeux de 5.0 % de CO<sub>2</sub>, 11.9 % d'O<sub>2</sub> et de 83.1 % en azote. La pression dans le vaisseau était maintenue à 45 mmHg par une pompe reliée à un transducteur enregistrant les variations. Le vaisseau a été stabilisé dans son milieu pour une période de 45 minutes avant de commencer l'étude.

### ***Détermination de la dose de précontraction à la norépinephrine (NE)***

La NE agit directement sur le muscle lisse et en provoque la contraction via des récepteurs adrénergiques. Une courbe de la réponse vasculaire à la NE permet de trouver la dose EC75 (dose correspondant à 75 % de la réponse maximale) qui permet de précontracter le vaisseau avant l'étude de la capacité vasodilatatrice en réponse à un agent pharmacologique. Des doses de 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-4</sup> M ont été utilisées et distribuées sur l'axe des abscisses ayant subi une transformation logarithmique. Les variations de diamètre du vaisseau ont été rapportées sur l'axe des ordonnées de façon relative, en prenant le diamètre du vaisseau au repos, suite à la période de stabilisation dans le milieu physiologique, comme valeur de 100 %. En tout temps lors des différentes étapes de l'étude vasculaire, la dose EC75 de la NE était présente dans le bain avant de commencer l'évaluation de la réponse vasodilatatrice.

### ***Étude vasculaire***

Trois étapes permettent d'évaluer la fonction endothéliale. L'obtention des réponses à l'acétylcholine (Ach), celles au nitroprussiate de sodium (SNP) et celles à l'Ach en présence d'un inhibiteur du monoxyde d'azote synthase (le L-NAME) ont été comparées pour les deux groupes de cette étude. Des doses de 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-4</sup> M ont été utilisées pour l'Ach, alors que l'étude avec le SNP a été faite avec des doses de

$10^{-9}$  à  $10^{-3}$  M. Le L-NAME était incubé pour une période de 20 minutes à une dose de  $10^{-4}$  M avant d'évaluer la réponse à l'Ach suite à l'inhibition des NOS. Entre chaque étape, le vaisseau est rincé trois fois et stabilisé pour une période de 30 minutes pour le ramener à son diamètre de repos correspondant à la valeur relative de 100 % de son diamètre. Après l'observation des réponses aux différentes doses, le vaisseau a été rincé trois fois avec la solution physiologique a été disposé d'une période de repos de 30 minutes pour stabiliser à nouveau son diamètre à la valeur de repos (diamètre initial correspondant à la normalisation de 100 %).

### ***Étude dépendante de l'endothélium***

L'Ach entraîne la production de NO en activant la monoxyde d'azote synthase via sa liaison à un récepteur cholinergique situé sur la cellule endothéliale. Le NO produit diffusera ensuite vers le muscle et liera son récepteur soluble dans la cellule musculaire lisse pour relâcher ce dernier. En considérant l'information décrite plus haut, nous identifions clairement trois systèmes en équilibre, soit le système réactionnel de l'Ach et son récepteur, le système enzymatique de la NOS et le système du récepteur liant le NO. Cette cascade de réactions finira par se traduire en un relâchement du muscle vasculaire lisse évalué via l'augmentation du diamètre vasculaire, effet biologique observé en fonction de la dose d'Ach rapportée sur le graphique pour les deux groupes de rats.

### ***Étude indépendante de l'endothélium***

Le SNP est un donneur de NO et a son effet relaxant directement sur le muscle vasculaire lisse. Une courbe dose-réponse de la dilatation provoquée par le NO directement libéré permet de comparer la réponse entre nos deux groupes. L'avantage d'utiliser un donneur de NO est qu'il validera que ce dernier est bel et bien apte à provoquer la réponse produite et observée suite à la liaison de l'Ach à son récepteur. Cette précaution renforce la présomption que cette liaison de l'Ach

provoque effectivement la synthèse de NO ayant la puissance de dilater le vaisseau sanguin de la même façon qu'un donneur de NO.

### ***Étude contrôle dépendante de l'endothélium***

Le L-NAME (N (G)-nitro-L-arginine methyl ester) est un inhibiteur non sélectif des NOS. Celui-ci permet d'évaluer que la réponse relaxante due à l'Ach provient effectivement de la production de NO par le monoxyde d'azote synthase. En bloquant la synthèse enzymatique de NO, la réponse dilatatrice provoquée en présence de l'Ach devrait être diminuée ou éliminée en conséquence des principes de la loi de l'action de masse énoncés plus haut.

### **Analyse des résultats**

Pour chacune des étapes de l'étude de la fonction endothéliale, les réponses relatives de dilatation sont moyennées pour chacun des groupes et rapportées sur différents graphiques. Pour chaque drogue, quatre graphiques ont été tracés. Ces graphiques correspondent au temps post transfusion où les animaux ont été sacrifiés (un mois, six mois, huit mois). Un quatrième graphique regroupe tous les résultats. L'intérêt de sacrifier les animaux à différents temps était de voir si la condition vasculaire allait se détériorer à plus long terme, rester stable ou plutôt se rétablir.

### ***Validation statistique***

Les données ont été compilées dans une table d'ANOVA à deux variables avec mesures répétées. Les deux facteurs dépendants sont le groupe et la dose.

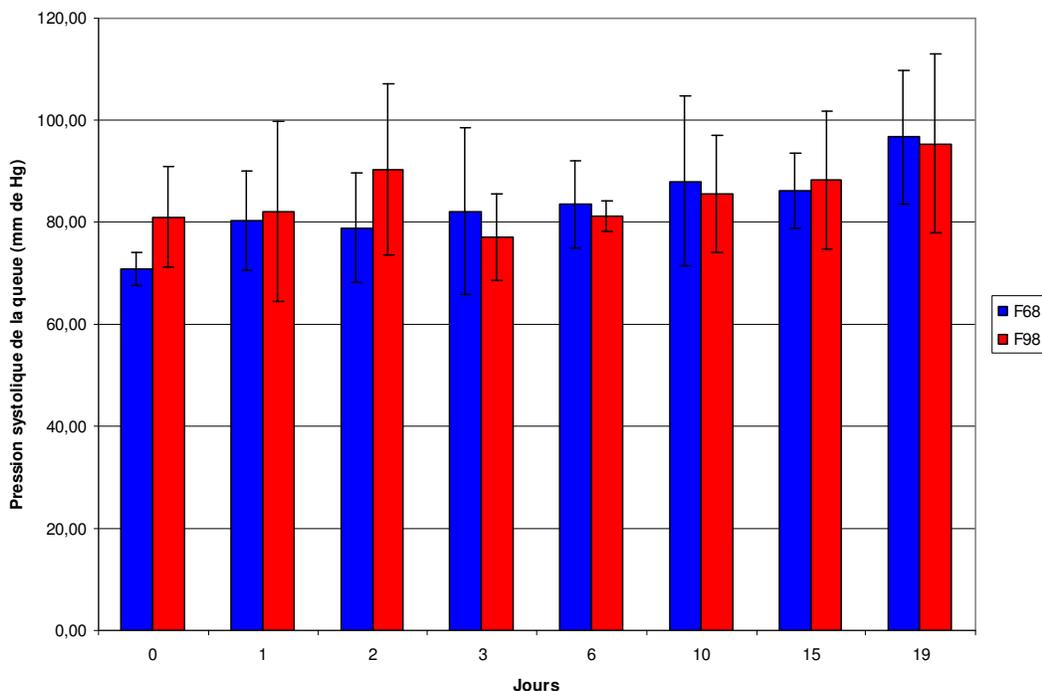
## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

### *PRÉSENTATION DES RÉSULTATS LONGITUDINAUX*

Nous présenterons d'abord les valeurs de pression pour vérifier si notre hypothèse quant au maintien de cette variable par les mécanismes d'homéostasie est bel et bien vérifiée. Nous verrons ensuite dans l'ordre, les valeurs du débit cardiaque, du rythme cardiaque, de la fraction d'éjection et du volume systolique, chacun déterminé à la suite de la segmentation d'images telle que décrite dans la méthode. Enfin, nous présenterons les estimations de la résistance périphérique tout au long du suivi longitudinal. Les résultats des tests statistiques seront ensuite compilés dans un même tableau aux fins de discussion. Dans tous les cas, la couleur bleue sera associée au groupe transfusé avec du sang contrôle dont le copolymère est le F68, alors que le rouge représentera le groupe transfusé avec le sang traité au copolymère F98 donnant aux érythrocytes des propriétés hyperagrégantes.

### **Effets de l'hyperaggrégation érythrocytaire sur la pression systolique de la queue**

Le graphique 1 représente la variation de la pression systolique de la queue du rat en fonction du temps ainsi que les barres d'écart-types associées aux valeurs. Les mesures ont été prises sous anesthésie à 2 % d'isoflurane. Tel que mentionné dans la section méthodologie, il a été démontré qu'il existe une corrélation entre la pression systolique de la queue et la pression artérielle moyenne (74), ce qui nous amène en tant qu'observateur à nous attendre à une constance pour les deux groupes à l'intérieur d'une fenêtre de valeurs homéostatiques, tel que décrit dans le chapitre un.



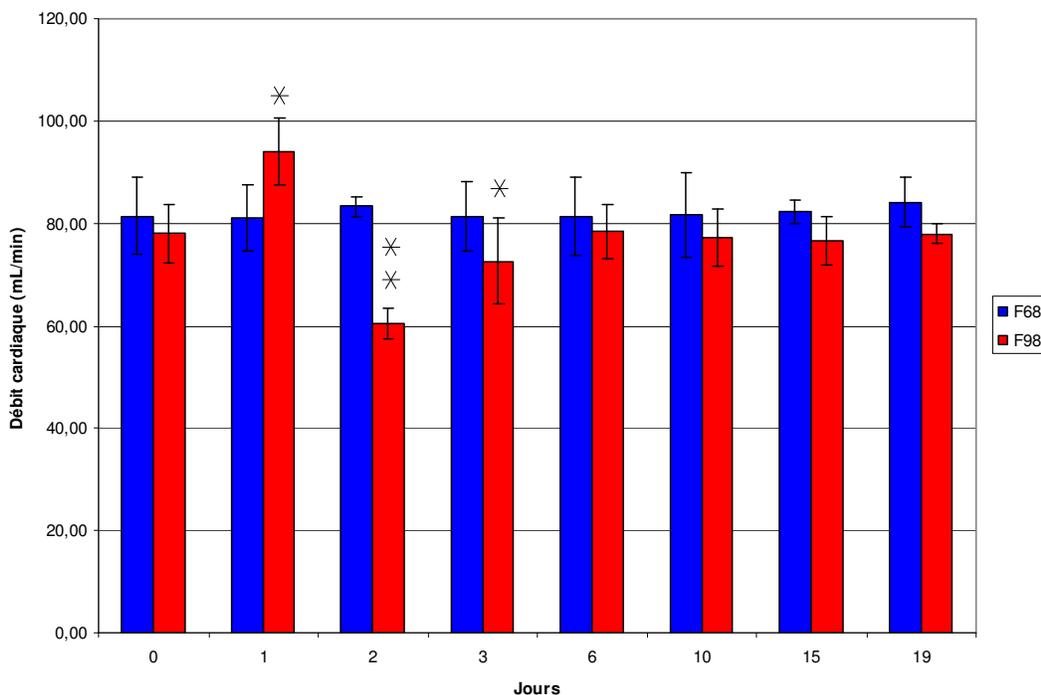
**graphique 1 :Évolution de la pression systolique de la queue chez le rat en fonction du temps post transfusion, sous anesthésie à 2% d’isoflurane.** Le jour 0 correspond à la mesure effectuée avant la transfusion des globules rouges modifiés au polymère F68 et F98. Les barres d’erreurs indiquent l’écart-type des mesures.

Tel qu’attendu, l’analyse de variance à deux variables dépendantes (groupe et jour) ne montre aucune variation significative de la pression. Nous ne pouvons donc pas rejeter l’hypothèse suggérant que les mécanismes d’homéostasie de la pression artérielle moyenne réussissent à tamponner les effets de la transfusion de sang avec des globules rouges hyperagrégants. La suite des résultats permettra de vérifier quelles adaptations cardiaques pourraient être responsables de l’homogénéité des valeurs de pression observées.

### **Effets de l’hyperagrégation érythrocytaire sur le débit cardiaque**

Le graphique 2 met en comparaison l’évolution du débit cardiaque posttransfusion entre les deux groupes. Les valeurs utilisées dans l’histogramme sont celles calculées suite à la segmentation d’images (« VisualSonics Cardiac

Measurement Package ») et la valeur au temps zéro représente le débit cardiaque en préchirurgie.



**Graphique 2 : Évolution du débit chez le rat en fonction du temps post transfusion, sous anesthésie à 2 % d'isoflurane.** Le jour 0 correspond à la mesure effectuée avant la transfusion des globules rouges modifiés au polymère F68 et F98. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type des mesures. Une étoile  $p < 0.05$ , deux étoiles  $p < 0.001$ .

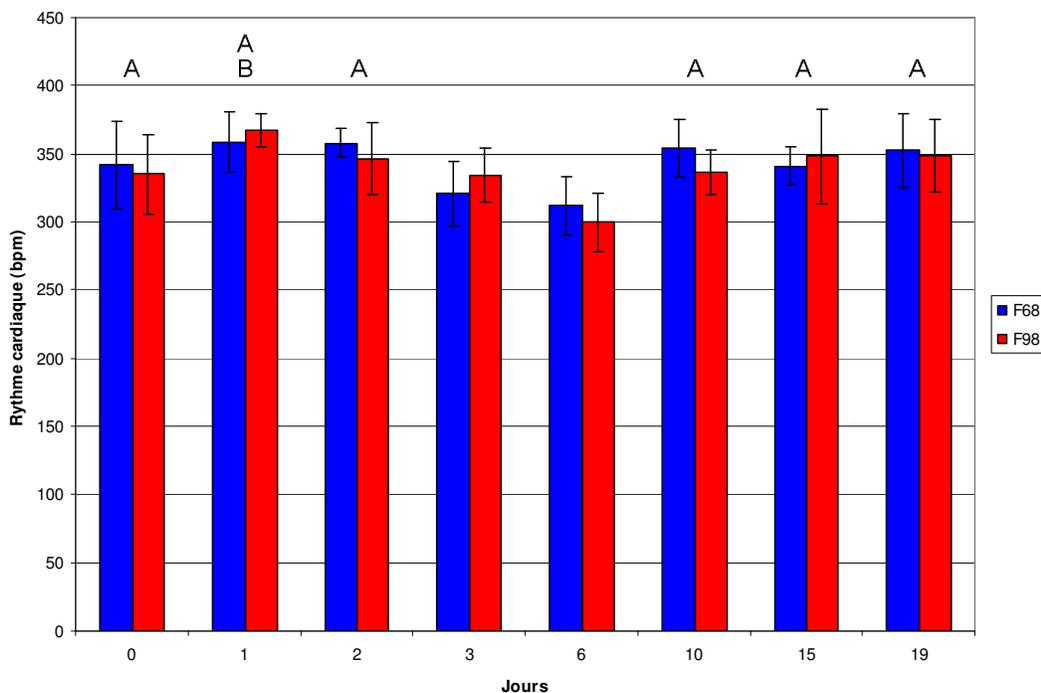
L'analyse de variance à deux variables confirme une interaction groupe-temps ( $p < 0.05$ ). L'analyse comparative des deux groupes par la méthode Holm-Sidak a permis d'identifier les différences notées au graphique 2. Mentionnons que pour le groupe transfusé avec du sang contrôle, aucune différence statistique n'est apparue en fonction du temps. En comparaison, le groupe traité au sang hyperagrégant montre des variations transitoires du débit aux jours 1 et 2 ( $p < 0.03$ ). Ces adaptations sont caractérisées par une augmentation du débit au jour un ( $p < 0.03$ ) et une diminution plus marquée au jour deux ( $p < 0.001$ ), suivi d'une normalisation à la valeur du débit pré-intervention à partir du jour 3 ( $p < 0.035$ ). Puisque nous avons noté des différences significatives entre les deux groupes aux jours un à trois, il nous est donc possible d'appuyer l'hypothèse que le débit cardiaque est impliqué dans le maintien de la pression artérielle moyenne pour le

groupe F98. Il a d'ailleurs été démontré que le cœur module le flot sanguin de manière à maintenir des contraintes de cisaillements physiologiques suite à une modification des caractéristiques rhéologiques induite par des variations de la viscosité plasmatique (62).

Afin d'expliquer les variations de débit, nous avons observé de plus près le rythme cardiaque, la fraction d'éjection et le volume systolique qui ont tous un impact sur le débit cardiaque (79). Des variations du rythme cardiaque pourraient être associées à une réponse adaptatrice du réflexe des barorécepteurs, alors que des différences au niveau des volumes systoliques impliqueraient des effets rhéologiques sur le retour veineux (80). Enfin, des différences de la fraction d'éjection seraient un gage de modification de la fonction cardiaque au niveau de la force de contraction, plus souvent associée à des adaptations physiologiques à long terme (81)

### **Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur le rythme cardiaque**

Rappelons que le rythme cardiaque est une adaptation très rapide du système cardiovasculaire permettant de réguler la pression et de perfuser les organes de façon adéquate. Cette variable, représentée au graphique 3, est principalement modulée par les baroréflexes dont les récepteurs de pression se trouvent à la sortie du cœur pour être témoin de l'efficacité de la résultante cardiaque.

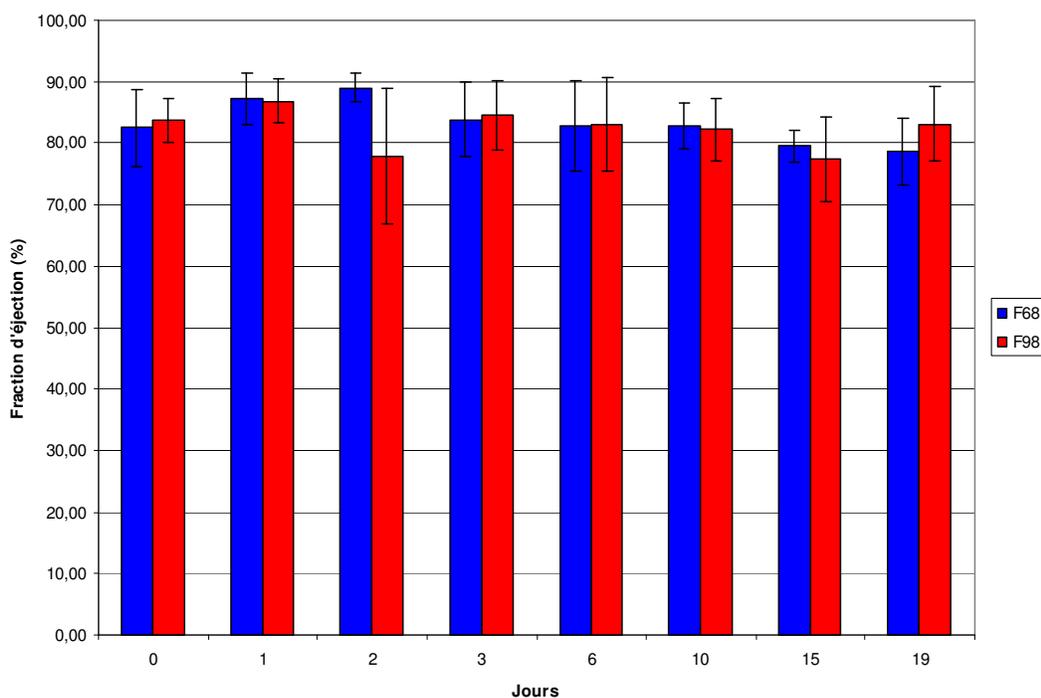


**Graphique 3 : Évolution du rythme cardiaque chez le rat en fonction du temps post transfusion, sous anesthésie à 2% d'isoflurane.** Le jour 0 correspond à la mesure effectuée avant la transfusion des globules rouges modifiés au polymère F68 et F98. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type des mesures. La lettre A sur le graphique indique les différences par rapport au jour six alors que la lettre B a été utilisée pour noter la différence avec le jour trois. ( $p < 0.05$ )

À la suite du test statistique, aucune interaction n'a été remarquée entre la variable groupe et la variable jour, et aucune différence n'a été relevée entre les groupes. Il ne nous est donc pas possible de conclure que le rythme cardiaque à lui seul est responsable des modifications observées du débit. Toutefois, des variations significatives temporelles du rythme cardiaque ont été notées. Bien qu'il nous soit impossible d'expliquer ces différences, elles n'interviennent pas dans l'explication des variations de débits et sont donc probablement compensées par des mécanismes homéostatiques. Nous en concluons que ces variations n'ont probablement pas d'importance biologique, puisque le rythme cardiaque est une variable qui bouge très rapidement et que les valeurs sont mesurées au même moment et avec le même système (Vevo) que les valeurs de débit, qui ne démontrent pas de différences entre les jours. Ces différences ne proviennent donc pas d'un manque de rigueur puisqu'elles se seraient manifestées sur nos autres valeurs.

## Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur la fraction d'éjection

La fraction d'éjection est le pourcentage du volume expulsé du ventricule gauche à la suite de la contraction cardiaque. Le graphique 4 permet donc de vérifier si les variations de débit sont attribuables à une différence dans la force de la contraction cardiaque.

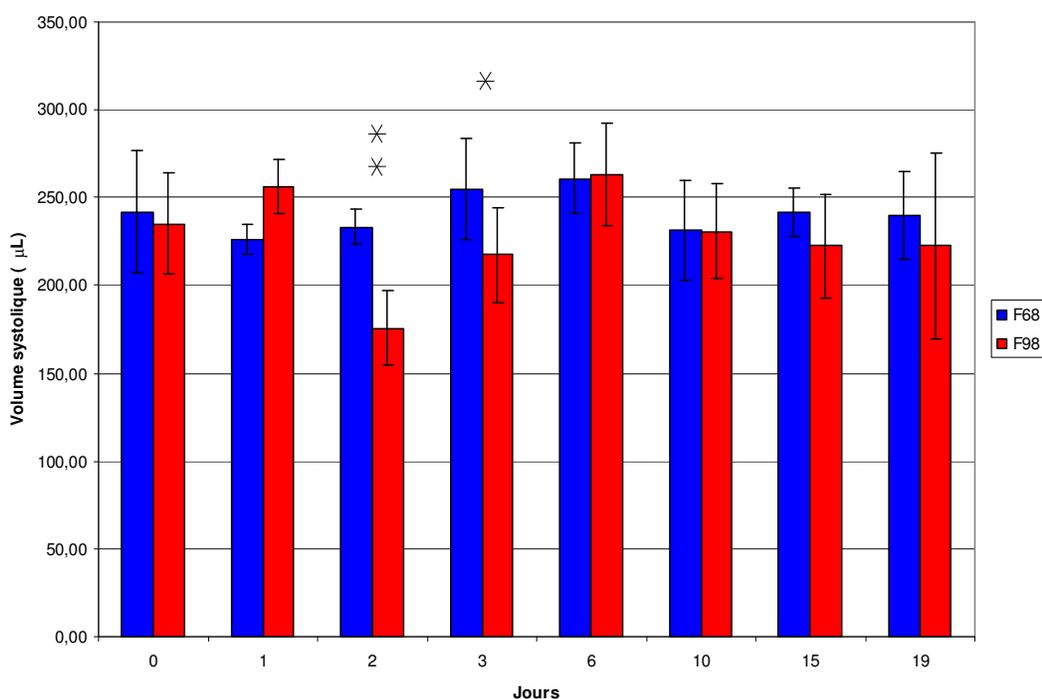


**Graphique 4 : Évolution de la fraction d'éjection chez le rat en fonction du temps post transfusion, sous anesthésie à 2% d'isoflurane.** Le jour 0 correspond à la mesure effectuée avant la transfusion des globules rouges modifiés au polymère F68 et F98. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type des mesures.

À la suite du test statistique, aucune interaction n'a pu être rapportée entre le facteur jour et le facteur groupe. L'observation de ces deux variables dépendantes ne nous a pas non plus permis d'identifier de différences significatives en fonction du temps ou entre les groupes. Il nous faut donc rejeter l'hypothèse que la fraction d'éjection à elle seule soit responsable des modifications observées sur le débit.

## Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur le volume systolique

Le dernier facteur à valider est le volume systolique, correspondant au volume en début de systole du ventricule gauche lors de la contraction cardiaque. Il dépend notamment du volume de la chambre cardiaque et de son remplissage (80). Les valeurs calculées par le « VisualSonics Cardiac Measurement Package » à la suite de la segmentation du ventricule sont rapportées au graphique 5.



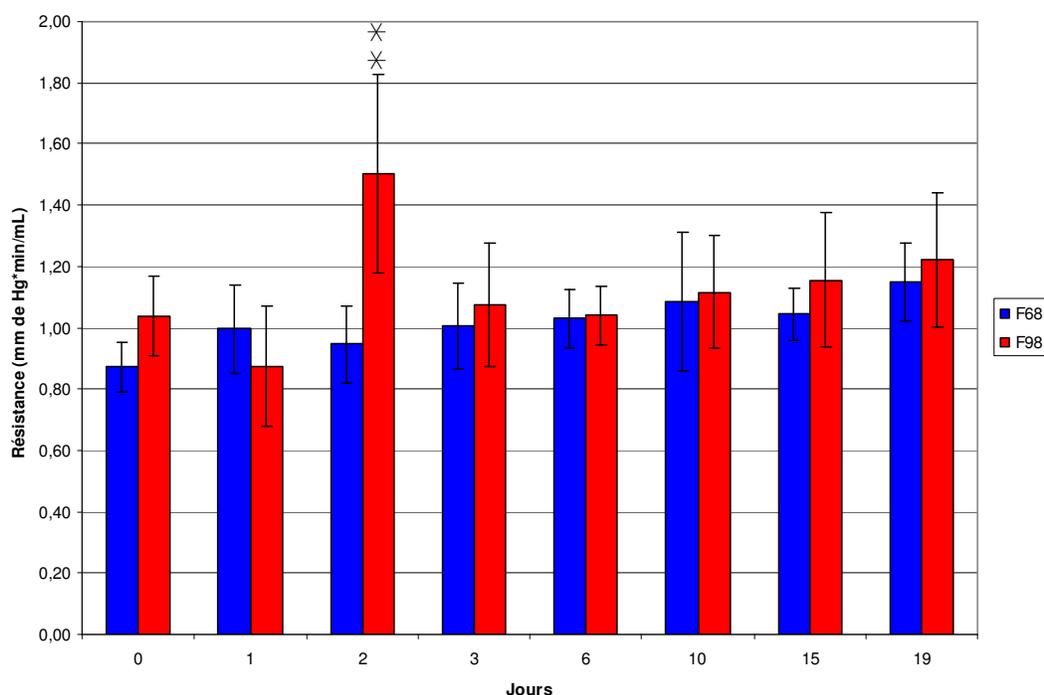
**Graphique 5 : Évolution du volume systolique en fonction du temps post transfusion, sous anesthésie à 2% d'isoflurane.** Le jour 0 correspond à la mesure effectuée avant la transfusion des globules rouges modifiés au polymère F68 et F98. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type des mesures. Une étoile  $p < 0.05$ , deux étoiles  $p < 0.001$ .

Les analyses statistiques ont démontré une interaction entre les groupes et les jours, c'est-à-dire que le volume systolique des deux groupes se comporte différemment l'un de l'autre selon les jours ( $p < 0.05$ ). Aucune variation significative du volume systolique n'a été remarquée en fonction du temps pour le groupe contrôle. Par contre, des différences temporelles ont été identifiées pour le groupe F98 aux jours 2 et 3 ( $p < 0.02$ ). Cette variation temporelle se traduit par une

différence significative entre les deux groupes aux jours 2 ( $p < 0.001$ ) et 3 ( $p < 0.05$ ), tel qu'indiqué sur le graphique. Le volume d'éjection systolique semble donc être en partie ou totalement responsable des différences de débit remarquées au graphique 2, plus précisément celles aux jours 2 et 3.

### Effets de l'hyperagrégation érythrocytaire sur la résistance périphérique

La résistance périphérique est estimée par le ratio de la pression artérielle moyenne (graphique 1) et du débit cardiaque (graphique 2). Le graphique 6 montre une différence significative entre les groupes F68 et F98 au jour 2 ( $p < 0.001$ ).



**Graphique 6 : Évolution de la résistance périphérique en fonction du temps post transfusion, sous anesthésie à 2% d'isoflurane.** Le jour 0 correspond à la mesure effectuée avant la transfusion des globules rouges modifiés au polymère F68 et F98. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type des mesures.

Donc en détail, les tests statistiques ont révélé une interaction jours-groupes. Pour le groupe contrôle, aucune variation temporelle significative de la résistance

périphérique n'a pu être démontrée; cependant, une telle variation temporelle est observée pour le groupe F98 ( $p < 0.02$ ).

### Résumé des résultats statistiques longitudinaux

Le tableau 4 est une synthèse des résultats du suivi longitudinal et des analyses statistiques à l'aide d'une table d'ANOVA à deux variables sur mesures répétées. Nous avons identifié les jours auxquels des différences statistiques ont été relevées entre nos deux groupes (cases jaunes).

Paramètre observé	Jour							
	0	1	2	3	6	10	15	19
Pression systolique de la queue	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Débit	Non	▲ ( $p < 0,03$ )	▼ ( $p < 0,001$ )	▼ ( $p < 0,035$ )	Non	Non	Non	Non
Rythme cardiaque	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Fraction d'éjection	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Volume systolique	Non	Non	▼ ( $p < 0,001$ )	▼ ( $p < 0,05$ )	Non	Non	Non	Non
Résistance périphérique	Non	Non	▲ ( $p < 0,001$ )	Non	Non	Non	Non	Non

**Tableau 4 : Différences statistiques entre les deux groupes selon les paramètres observés.**

Au premier jour suivant la transfusion, nous avons observé une augmentation du débit cardiaque chez le groupe transfusé avec du sang hyperagrégant. Le jour suivant, nous avons plutôt observé une diminution du débit cardiaque, une diminution du volume systolique, en plus d'une augmentation de la résistance périphérique par rapport au groupe contrôle. Enfin, le jour trois s'est démarqué par une différence à la baisse du groupe F98 par rapport au groupe contrôle au niveau du débit cardiaque et du volume systolique. La section qui suit discutera de la suite logique d'événements proposés pour expliquer les différences mentionnées ci-haut.

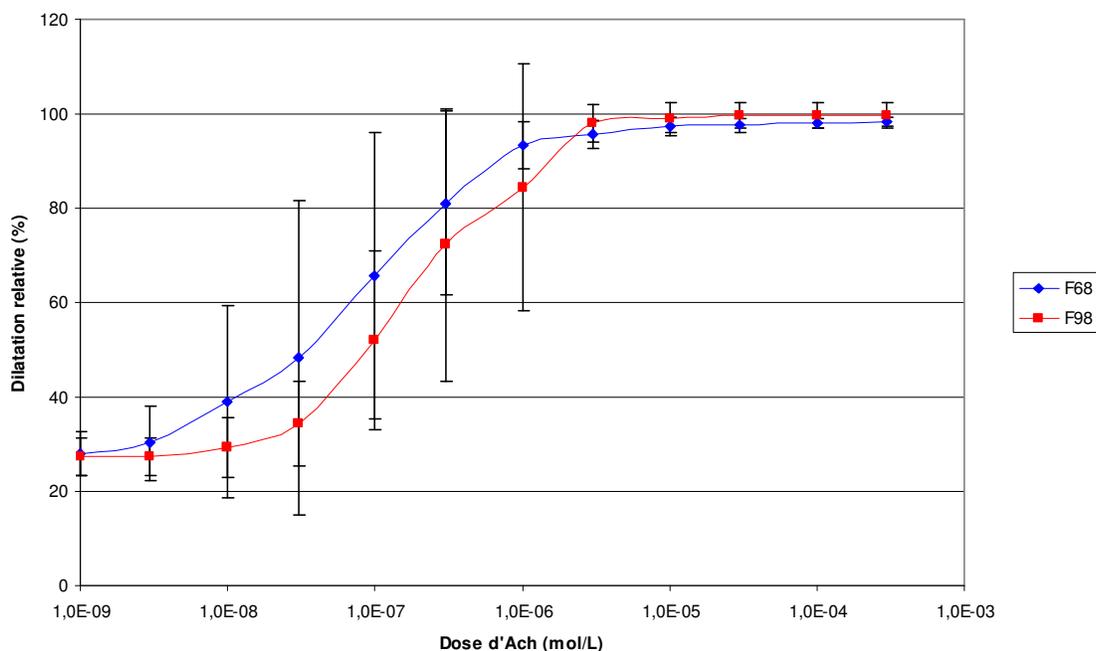
### ***PRÉSENTATION DES RÉSULTATS DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE***

Le bleu est utilisé pour représenter les valeurs du groupe transfusé avec le sang contrôle pour lequel les globules rouges ont un revêtement de copolymères F68,

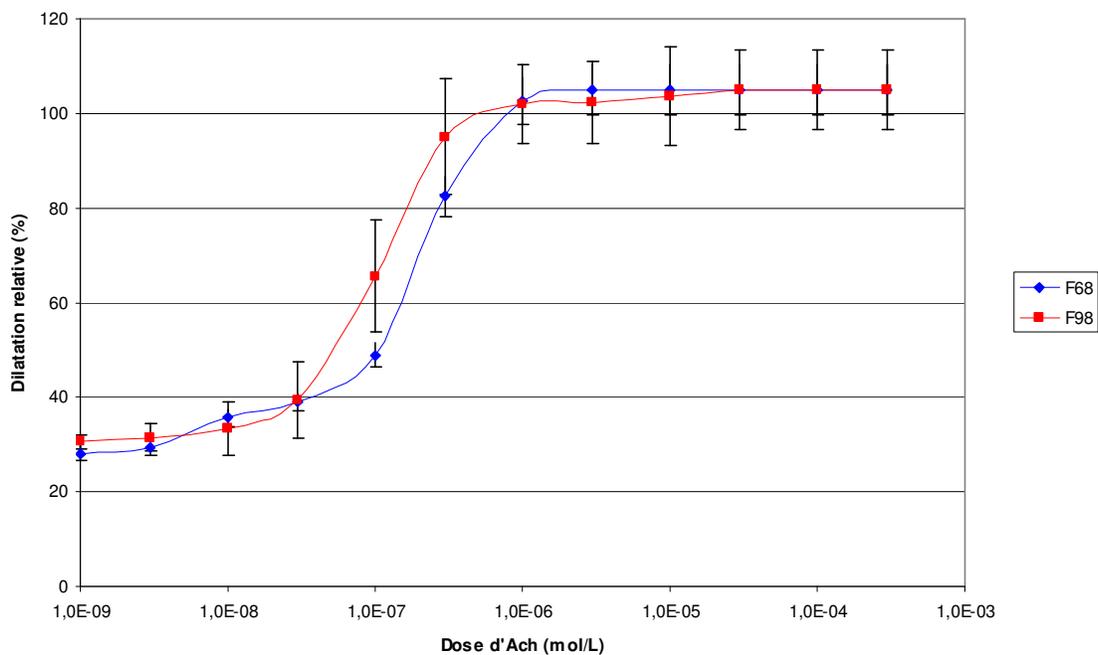
alors que le rouge est la couleur utilisée pour le groupe transfusé au sang hyperagrégant dont les forces d'adhésion entre les érythrocytes ont été modifiées par un revêtement de copolymères F98.

### Étude de la relaxation dépendante de l'endothélium

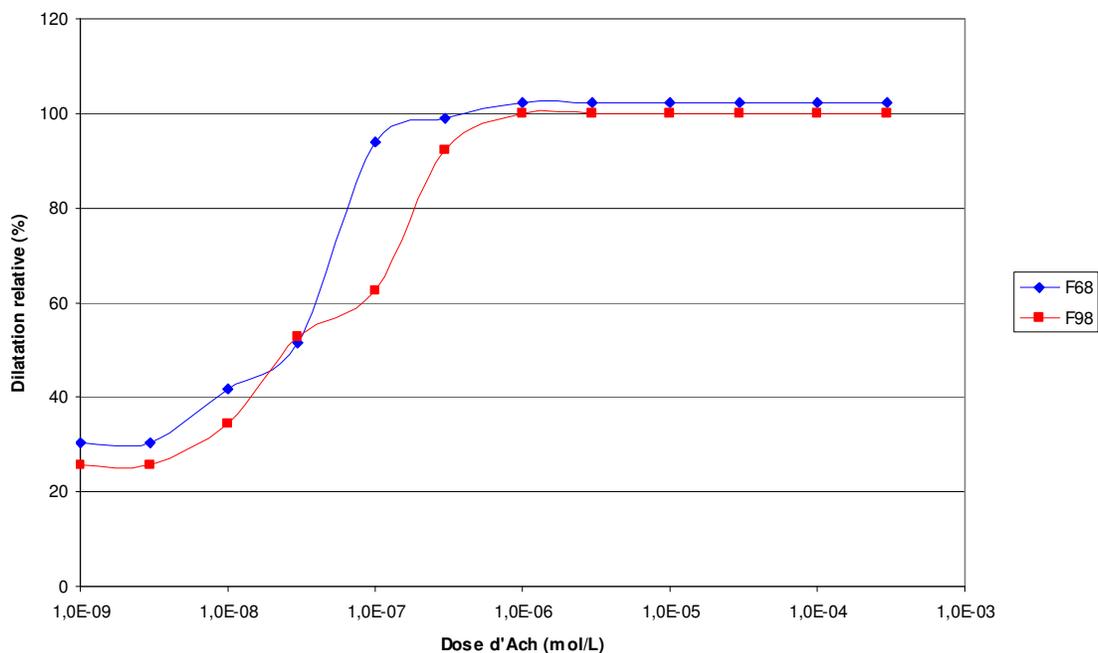
L'étude de la relaxation dépendante de l'endothélium est présentée aux graphiques 7 à 10; une dose de préconditionnement de norépinephrine à  $10^{-5}$  M a été utilisée. Le plateau qui tend à être atteint pour les doses supérieures d'Ach est indicateur de la capacité de l'endothélium à ramener le diamètre vasculaire à sa réponse maximale normalisée à 100 %.



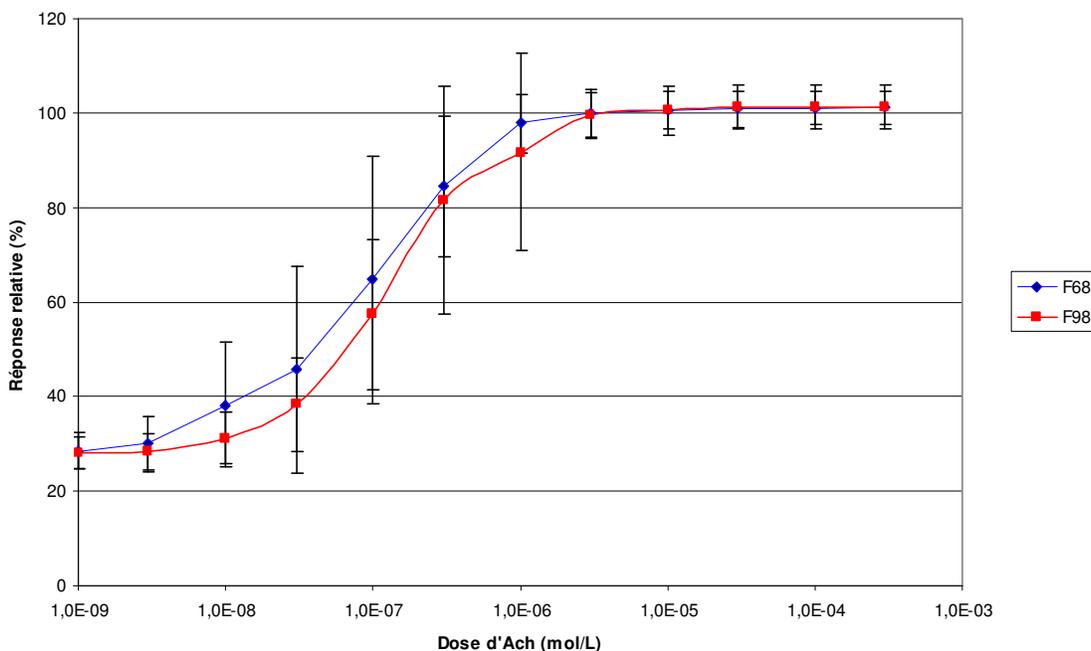
**Graphique 7 : Réponse dilatatrice relative du vaisseau mésentérique des rats un mois post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine.** Les barres représentent les écarts-types.



**Graphique 8 : Réponse dilatatrice relative du vaisseau mésentérique des rats six mois post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine. Les barres représentent les écarts-types.**



**Graphique 9 : Réponse dilatatrice relative du vaisseau mésentérique des rats huit mois post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine.**

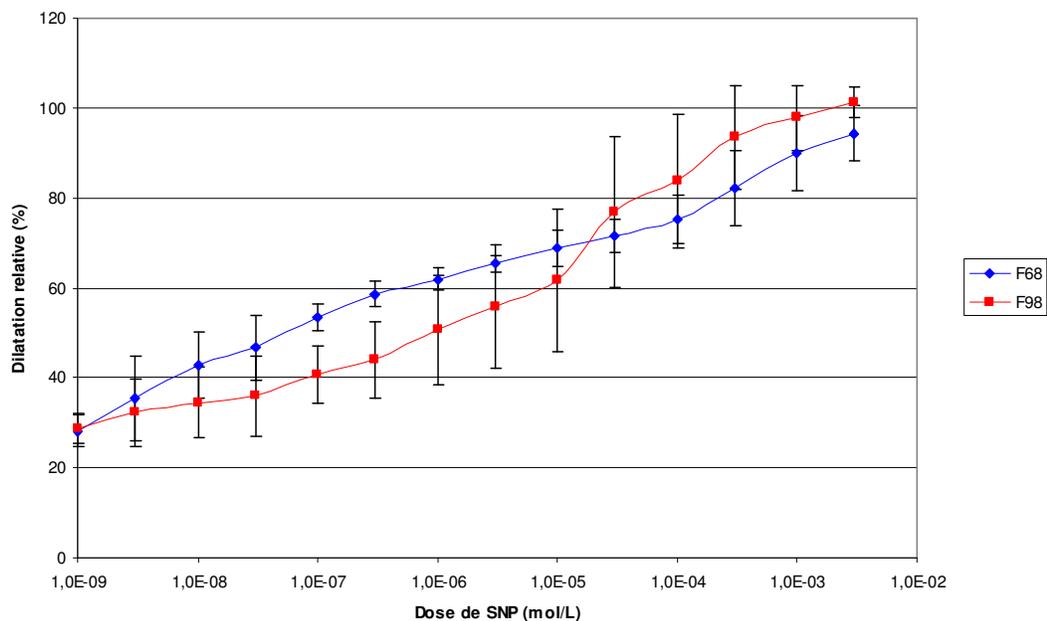


**Graphique 10 : Réponse dilatatrice relative du vaisseau mésentérique de tous les rats post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine.** Les barres représentent les écarts-types.

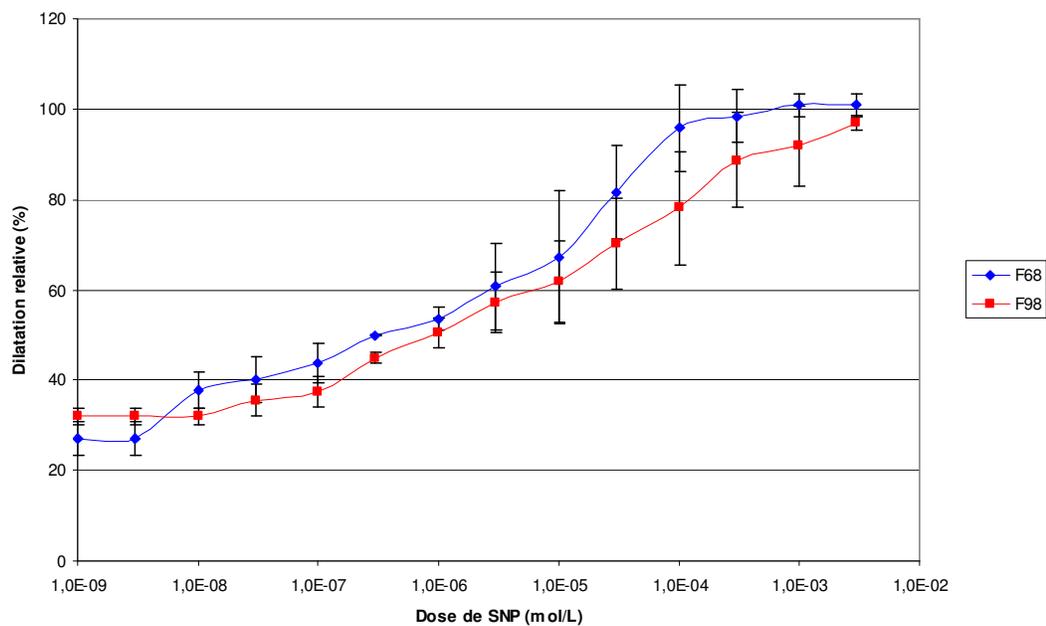
Le temps de sacrifice ne semble pas jouer sur la fonction vasculaire. L'analyse statistique dans une table d'ANOVA a donc été conduite sur les valeurs représentées au graphique 10. Puisqu'il y avait bel et bien interactions entre le facteur groupe et le facteur dose, il a été justifié de faire des analyses locales. Aucune différence significative n'a été constatée. Il ne nous est donc pas possible de conclure qu'une transfusion de sang hyperagrégant mène à une dysfonction endothéliale puisque nos deux groupes se comportent de la même façon en réponse à l'Ach.

### Étude de la relaxation indépendante de l'endothélium

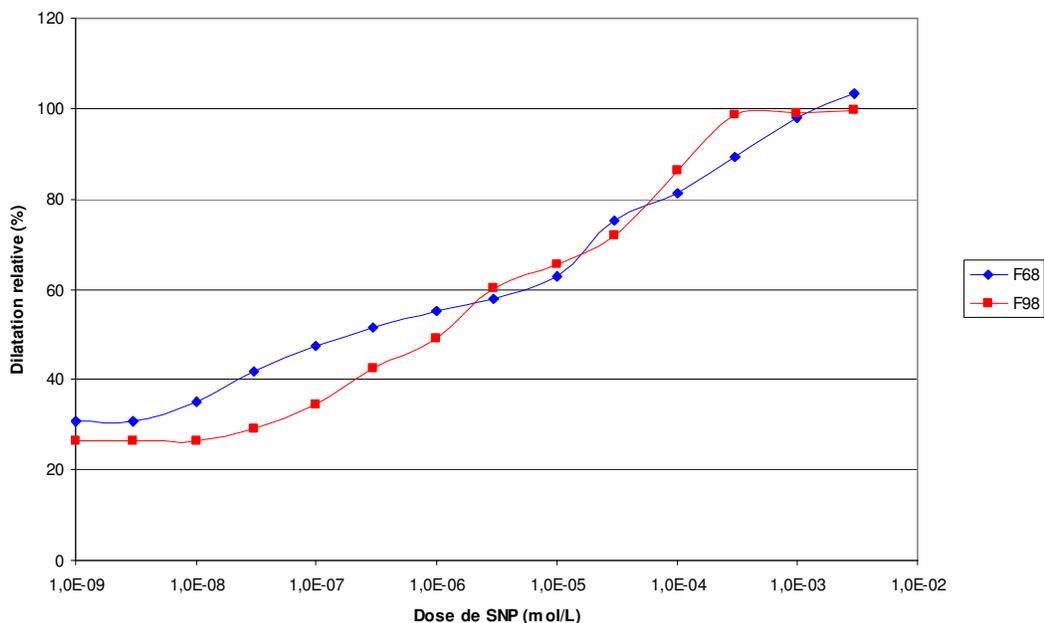
L'étude de la relaxation vasculaire indépendante de l'endothélium illustrée aux graphiques 11 à 14 est faite avec du nitroprussiate de sodium qui joue son effet directement sur le muscle vasculaire lisse, via la libération de NO. Un préconditionnement de norépinephrine à  $10^{-5}$  M a également été utilisé pour cette étude.



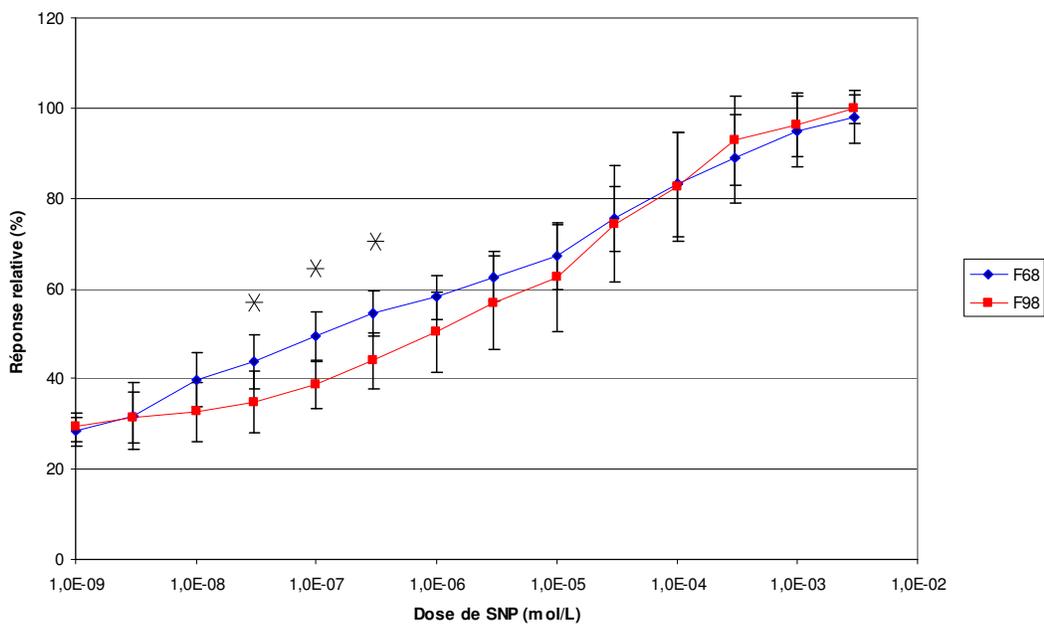
**Graphique 11 : Réponse relative vasculaire du vaisseau mésentérique des rats un mois post transfusion en fonction de la dose de nitroprussiate de sodium.** Les barres représentent les écarts-types.



**Graphique 12 : Réponse relative vasculaire du vaisseau mésentérique des rats six mois post transfusion en fonction de la dose de nitroprussiate de sodium.** Les barres représentent les écarts-types.



**Graphique 13 : Réponse relative vasculaire du vaisseau mésentérique des rats huit mois post transfusion en fonction de la dose de nitroprussiate de sodium.**

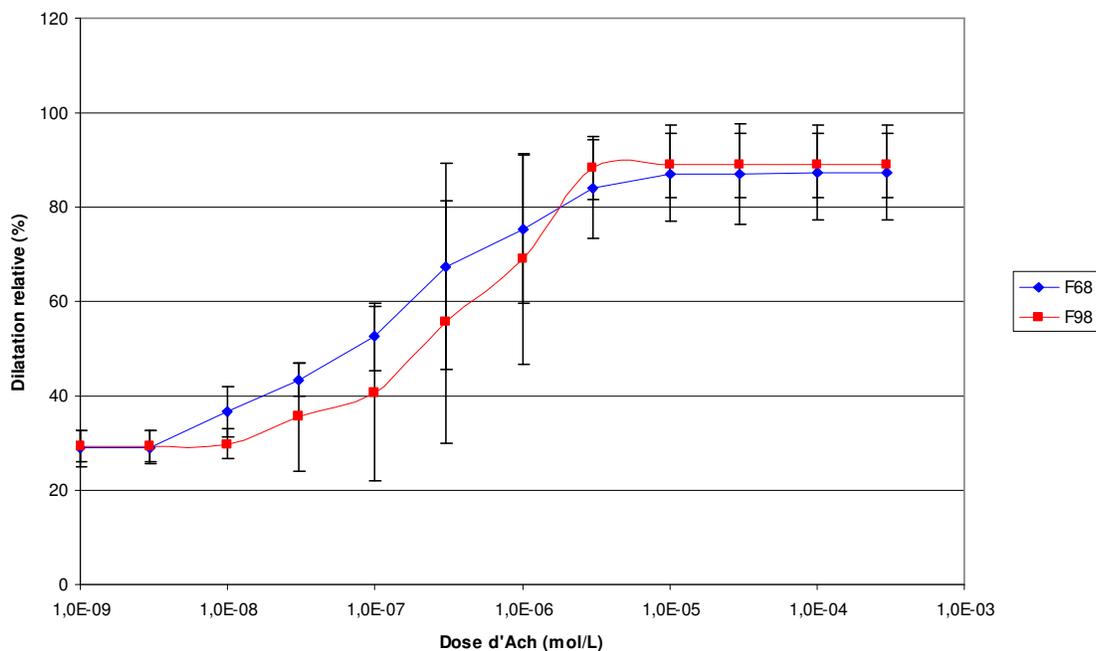


**Graphique 14 : Réponse relative vasculaire du vaisseau mésentérique de tous les rats post transfusion en fonction de la dose de nitroprussiate de sodium. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux groupes ( $p < 0.05$ ). Les barres représentent les écarts-types.**

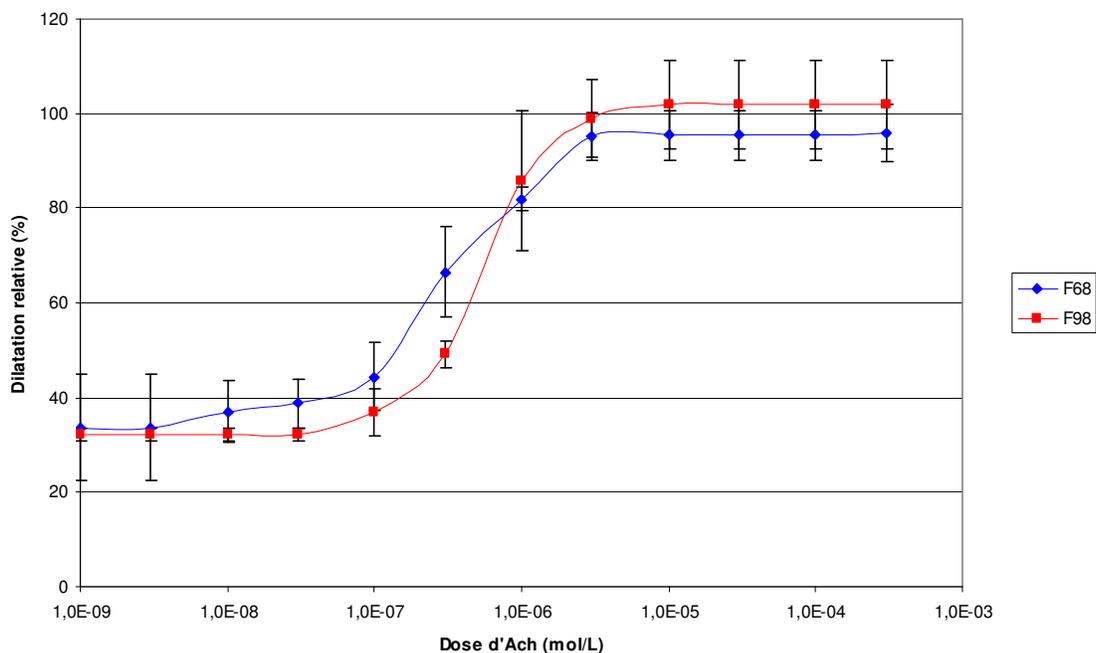
Idem aux résultats précédents, les courbes semblent se comporter de la même façon selon le temps du sacrifice et l'analyse statistique a été conduite sur les résultats totaux illustrés au graphique 14. L'analyse a révélé une interaction entre les facteurs dose et groupe, ce qui nous a permis de comparer les résultats localement. Des différences statistiques ( $p < 0.05$ ), marquées d'une étoile sur le graphique, ont été remarquées aux doses ( $3 \cdot 10^{-8}$ ) M,  $10^{-7}$  M et ( $3 \cdot 10^{-7}$ ) M. Ces doses pour lesquelles les groupes ne se comportent pas de la même façon se retrouvent dans la partie où 50% de la réponse maximale est atteinte (EC50) correspondent à la portion linéaire et comparable des courbes semi-logarithmiques. Il n'est pas possible de conclure que l'activité microvasculaire indépendante de l'endothélium est la même pour les deux groupes. Il semble donc que le muscle lisse du mésentère des rats du groupe transfusé au sang hyperagrégant réponde moins bien au nitroprussiate de sodium que celui des rats du groupe transfusé au sang contrôle.

### **Étude contrôle de la relaxation dépendante de l'endothélium**

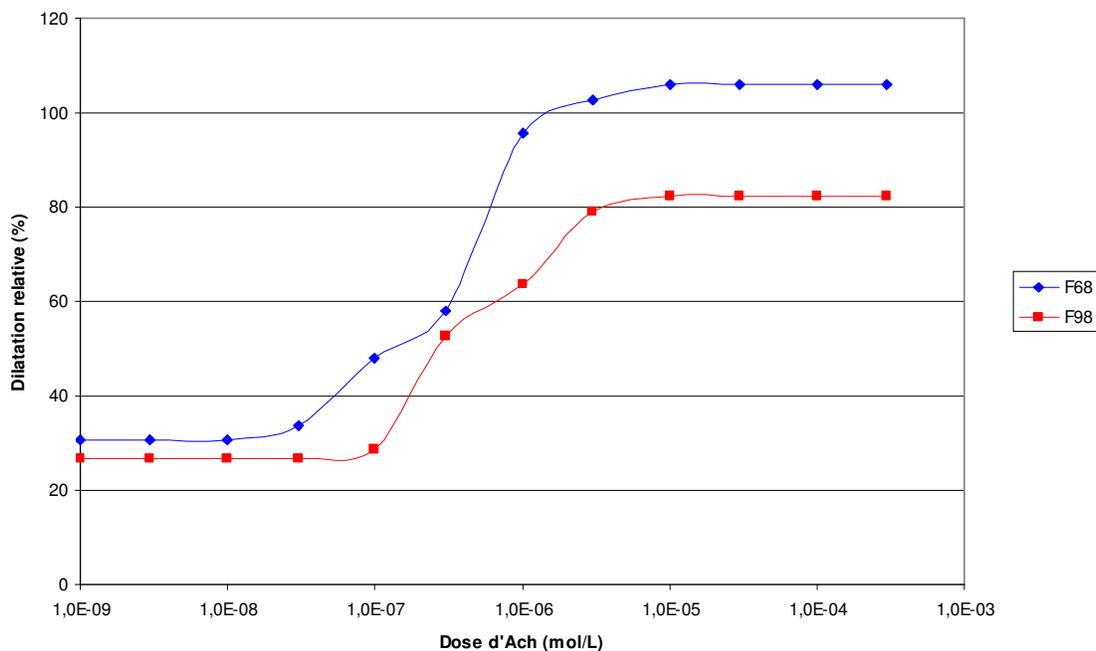
L'étude de la réponse dépendante de l'endothélium suite à l'incubation des vaisseaux au L-NAME devrait provoquer une atténuation de la réponse maximale suite à l'inhibition de la eNOS (graphiques 15 à 18). Ce n'est toutefois pas ce qui a été observé sur les graphiques qui suivent. Au cours des expérimentations, nous avons donc remplacé la drogue et refait les stocks de départ, sans succès. Il semblerait que les vaisseaux mésentériques chez le rat aient une résistance au L-NAME qui a aussi été observée par Mingorance et al. (82).



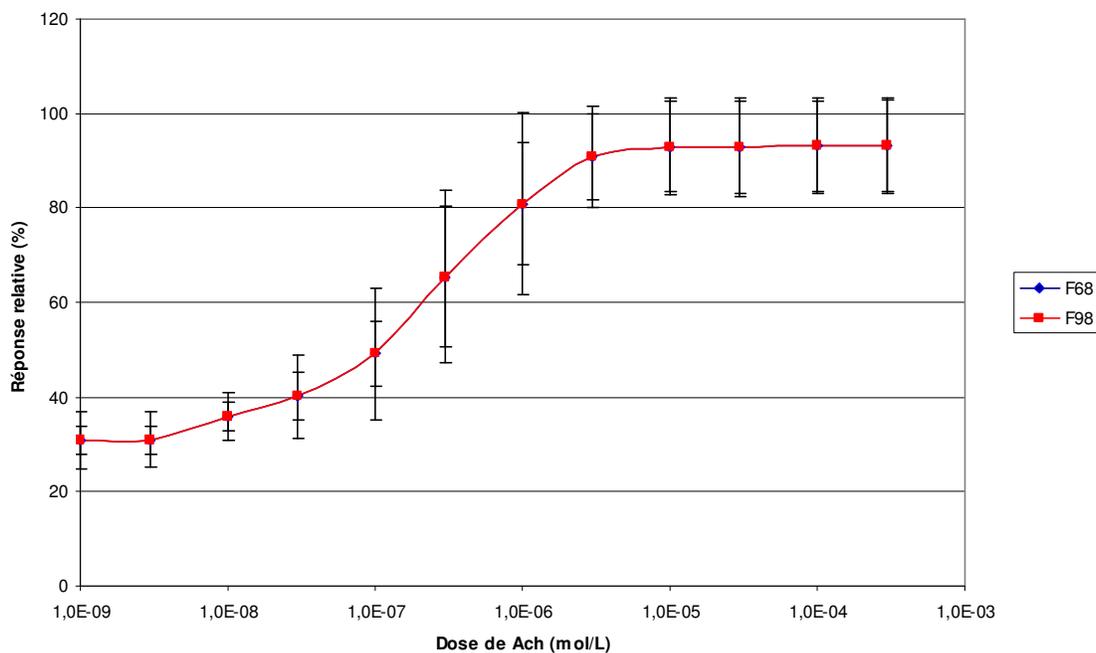
**Graphique 15 : Réponse maximale dilatatrice des vaisseaux mésentériques des rats un mois post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine en présence d'une dose de  $3,00 \cdot 10^{-3}$  mol/L de L-NAME. Les barres représentent les écarts-types.**



**Graphique 16 : Réponse maximale dilatatrice des vaisseaux mésentériques des rats six mois post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine en présence d'une dose de  $3,00 \cdot 10^{-3}$  mol/L de L-NAME. Les barres représentent les écarts-types.**



**Graphique 17 : Réponse maximale dilatatrice des vaisseaux mésentériques des rats huit mois post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine en présence d'une dose de  $3,00 \cdot 10^{-3}$  mol/L de L-NAME.**



**Graphique 18 : Réponse maximale dilatatrice des vaisseaux mésentériques de tous les rats post transfusion en fonction de la dose d'acétylcholine en présence d'une dose de  $3,00 \cdot 10^{-3}$  mol/L de L-NAME. Les barres représentent les écarts-types.**

Les résultats statistiques pour l'étude contrôle de la réponse dépendante de l'endothélium ressemblent beaucoup à ceux de la réponse à l'Ach au graphique 10. Les points des deux courbes sont superposés et aucune autre explication que le hasard ne peut être donnée pour en expliquer la cause. Des études statistiques locales ont été conduites. Aucune différence significative n'a été mesurée entre nos deux groupes au graphique 18, ce qui va dans le même sens que les résultats précédents obtenus à l'Ach (sans L-NAME).

## **CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION**

Le présent chapitre se veut une récapitulation de notre étude. La première partie fera la synthèse des résultats et discutera de nos interprétations. Viendra ensuite une comparaison avec l'étude de Baskurt et al. (65) et l'explication des différences entre les deux expérimentations. Pour finir, nous explorerons les perspectives futures.

### ***RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE LONGITUDINALE***

Le but du suivi longitudinal était de vérifier que les mécanismes de l'homéostasie réussiraient à maintenir la pression artérielle moyenne constante par divers mécanismes compensatoires influençant celle-ci suite à une transfusion de sang dont les globules rouges ont des propriétés hyperagrégeantes. Un sous-objectif était aussi d'expliquer comment cette régulation est opérée. À l'aide d'un biomicroscope ultrasonore utilisé en mode B et d'un dispositif non invasif permettant de mesurer la pression systolique de la queue, nous avons pu conclure que des adaptations cardiovasculaires pour maintenir la pression artérielle moyenne aux valeurs homéostatiques s'effectuent dans les trois premiers jours.

Nous avons observé que les valeurs de pression mesurées restaient constantes et allaient plutôt dans le même sens que notre hypothèse impliquant les mécanismes d'homéostasie. D'ailleurs, les adaptations du débit cardiaque dans les trois premiers jours témoignent du dynamisme de la réponse cardiovasculaire. Nous avons d'ailleurs identifié le volume systolique comme ayant un rôle important dans les fluctuations du débit suite à une augmentation de l'agrégation érythrocytaire. Les estimations de la résistance périphérique aux différents temps abondent aussi dans le sens d'une régulation cardiovasculaire pour le maintien de la pression, puisque des différences au niveau vasculaire sont observées entre les deux groupes.

Suite à l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire, le sang devient plus visqueux, les forces de cisaillement et le retour veineux sont augmentés. Une augmentation du débit cardiaque au jour un serait donc nécessaire pour maintenir la perfusion des organes malgré cette augmentation de viscosité.

Les adaptations cardiaques rapides pour le maintien homéostatique de la pression se déroulent dans un délai de 48 heures. Le réflexe des barorécepteurs que nous avons conservé a dû au départ envoyé un message à l'appareil juxtaglomérulaire au niveau du rein de façon à libérer les médiateurs nécessaires à l'augmentation du rythme cardiaque. Le débit cardiaque a ainsi pu générer les forces nécessaires pour briser les forces d'adhésion des érythrocytes et maintenir un écoulement vasculaire physiologique ne modifiant pas la résistance périphérique au jour 1.

Le jour deux est marqué par une diminution du volume systolique, ainsi qu'une diminution du débit cardiaque, probablement dû à l'adaptation connue pour se faire dans les deux premiers jours d'une adaptation cardiovasculaire de façon à éviter une hypertrophie du ventricule à long terme. La meilleure adaptation physiologique pour compenser la diminution du volume systolique subséquente à une diminution du débit cardiaque est donc d'augmenter la résistance périphérique de façon à favoriser le retour veineux vers le cœur.

Au troisième jour, la résistance périphérique retrouve sa valeur de référence et le débit cardiaque et le volume systolique cheminent vers leurs valeurs initiales au temps zéro. Le troisième jour correspond à la fin du délai de 48 heures d'adaptation du baroréflexe. Puisque la pression caudale de la queue ne démontrait pas de différences significatives avec le groupe contrôle et qu'aucune différence statistique n'a été décelée au niveau de la fraction d'éjection, nous supposons que les adaptations à plus long terme proviennent d'un remodelage permettant d'encaisser l'augmentation de viscosité sanguine. Une option pour maintenir un débit cardiaque et une résistance périphérique physiologique serait la modification du phénotype du

muscle vasculaire lisse, de façon à ce que son tonus myogène soit augmenté pour tamponner des forces de cisaillement pariétal augmentées.

### ***RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DE L'ÉVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE***

Il semblerait que la fonction endothéliale des vaisseaux du mésentère chez le rat BN ne soit pas modifiée suite à une transfusion par échange du tiers du volume sanguin pour du sang dont les globules rouges ont un revêtement de copolymère F98. Toutefois, il apparaît que la fonction vasculaire soit modifiée au niveau des cellules musculaires lisses. Les différences à la réponse au SNP en témoignent. Il serait évidemment nécessaire de pousser plus loin cette étude exploratoire et d'augmenter l'échantillonnage de manière à confirmer si tel est bien le cas.

Cela signifie qu'une dose d'Ach agissant sur l'endothélium engendre une réponse dilatatrice comparable chez les deux groupes, mais qu'une dose de NO agissant sur le muscle ne produit pas le même effet. Cela démontre que le muscle lisse du groupe traité au sang hyperagrégeant répond moins bien au NO que le groupe traité au sang contrôle. Pourtant, la fonction endothéliale semble intacte, dans le sens où aucune différence significative n'a été relevée entre les deux groupes. Une quantification des eNOS démontrerait peut-être une surexpression de l'enzyme. De cette façon, une plus grande production de NO pourrait entraîner une réponse physiologique adéquate compensant pour la résistance partielle du muscle à l'agent dilateur.

Il est possible que cette résistance au NO soit due à un remodelage du muscle lisse. Ces changements structurels peuvent survenir soit en réponse aux forces mécaniques, aux facteurs neurohumoraux ou aux agents paracrins et sont en général visible après deux jours de stimuli (83, 84). Tout justement, les artérioles de résistance exercent une autorégulation de la pression capillaire grâce à un niveau de

contraction indépendant des influences neurohumorales, le tonus myogène. Cette autorégulation permet de contracter ou de dilater les microvaisseaux selon les fluctuations de la pression. Puisque l'hyperagrégation érythrocytaire modifie la viscosité et change la pression exercée sur les artérioles, il se pourrait qu'il se produise un remodelage vasculaire protecteur pour les organes, sans pour autant qu'il y ait d'hypertrophie observée (89). Si tel est le cas, la résistance développée par le muscle lisse compenserait pour la surproduction de NO due à l'augmentation de stimuli mécanique au niveau du cisaillement pariétal.

Cette conclusion pourrait être supportée par le fait que le remodelage du cytosquelette et du muscle vasculaire lisse module la contractilité vasculaire, bien que les mécanismes ne soient pas à ce jour tout à fait clair. Effectivement, au niveau cellulaire et moléculaire, le remodelage comprend des changements dans les connexions intercellulaires, l'organisation du cytosquelette, ainsi que la composition de la matrice extracellulaire. Ces changements peuvent altérer la fonction vasculaire. Ils seront de façon primaire une réponse adaptative au flot du sang et à la pression, bien qu'ils puissent en venir à une phase de remodelage malsain, plus tard associé à une pathologie vasculaire (83, 84).

En terminant, le dernier chapitre sera une synthèse des trois étapes majeures de notre étude exploratoire et discutera des différences entre nos résultats expérimentaux et ceux obtenus en 2004 par Baskurt et al. (65). Nous mettrons aussi en lumière les perspectives futures.

### ***SYNTHÈSE RÉCAPITULATIVE DE L'ÉTUDE***

L'un des objectifs de l'étude était de vérifier si la pression artérielle moyenne serait maintenue chez le rat suite à une transfusion par échange de sang hyperagrégant produit par un revêtement de copolymères à la membrane des globules rouges. Pour valider les mécanismes de l'homéostasie tel que décrit dans la

littérature, les autres objectifs étaient de suivre ces rats dans le temps en observant *in vivo* leurs fonctions cardiaque et vasculaire (débit, volume systolique, fraction d'éjection, résistance périphérique) et d'effectuer des tests pharmacologiques *ex vivo* sur la fonction vasculaire. La synthèse des résultats permet de mieux comprendre les compensations *in vivo* du système cardiovasculaire.

Nos conclusions nous ont permis de valider l'hypothèse que l'homéostasie est capable, à moyen terme (i.e. après quelques jours), de tamponner les effets d'une augmentation aiguë de l'agrégation érythrocytaire. Effectivement, nous n'avons pas noté de variations de la pression artérielle. Tel qu'attendu, le cœur s'est vu responsable des adaptations dans les premières 48 heures, alors que le réseau microcirculatoire a pris le relai pour les adaptations subséquentes. Les adaptations observées au niveau vasculaire portent à croire que les facteurs mécaniques agissant sur le muscle vasculaire lisse entraînent les modifications vasculaires nécessaires au maintien de la pression et de la perfusion des organes.

### ***COMPARAISON DES RÉSULTATS AVEC CEUX DE L'ÉQUIPE DE BASKURT ET AL.***

Des différences importantes existent pourtant entre les résultats obtenus par l'équipe de la Turquie et les nôtres suite à une transfusion par échange du tiers du volume sanguin avec du sang hyperagrégant traité au F98 chez le rat. D'abord, ils ont observé une augmentation de la pression systolique de la queue du temps zéro jusqu'au sacrifice au jour quatre, alors que notre étude ne rapporte aucune variation significative. Ensuite, ils ont conclu à une dysfonction endothéliale appuyée par une réponse vasculaire moins sensible à l'acétylcholine et une diminution de l'expression d'eNOS, alors que nous n'avons pas observé de modification de la fonction endothéliale, mais plutôt des changements au niveau de la réponse du muscle lisse à un agoniste pharmacologique.

## Différences entre les protocoles

Avant de discuter des raisons entraînant ces différences de résultats, il est essentiel de décrire les modifications que nous avons apportées au protocole et de les justifier.

Premièrement, nous avons choisi le citrate de dextrose comme anticoagulant plutôt que l'EDTA. D'ailleurs, le comité d'éthique ne nous aurait pas permis de faire autrement. Mentionnons que le citrate de dextrose est l'anticoagulant utilisé chez l'humain pour les transfusions de sang. Cet anticoagulant bloque la cascade de coagulation des plaquettes, sans pour autant être un chélateur de calcium. L'avantage est qu'une fois réintroduit dans l'organisme, la coagulation reste efficace à la condition que le dosage soit administré de façon adéquate. Il va de soi que cette amélioration permet d'augmenter la pertinence du protocole puisqu'elle va en faveur du maintien des bonnes fonctions physiologiques de l'animal.

Pour ce qui est de l'euthanasie, elle s'est faite au CO<sub>2</sub> plutôt qu'avec une injection de xylazine-kétamine. Le choix de l'euthanasie a été recommandé par le comité d'éthique pour la protection des animaux.

Plus important encore, nous avons transfusé nos rats par les vaisseaux fémoraux à un débit de 0.75 mL/min plutôt qu'à un débit de 0.28 mL/min via une carotide et une jugulaire. Puisque la carotide et la jugulaire sont des vaisseaux situés très près du cœur et que le débit cardiaque est un joueur principal de la régulation de la pression artérielle moyenne, nous avons cru bon de nous en éloigner le plus possible pour minimiser les dommages aux gros vaisseaux et les impacts sur la régulation de la pression. D'ailleurs, tel que décrit dans notre chapitre un, la ligature des carotides provoque une décharge des barorécepteurs, ce qui vient introduire un biais énorme sur le contrôle de la pression artérielle moyenne. Le débit de transfusion choisi a été déduit par les valeurs de débit estimé lors de la mise au point du protocole chez notre modèle de rat anesthésié dans les mêmes conditions que celles

de la procédure finale. Cela nous a permis de maintenir la pression artérielle moyenne la plus constante possible tout au long de l'intervention.

Pour ce qui est du suivi cardiovasculaire dans notre protocole, il s'est déroulé sur 19 jours posttransfusion plutôt que quatre jours, puisqu'il restait une quantité appréciable de globules rouges marqués identifiés qualitativement au microscope après quatre jours posttransfusion (durée du protocole de Baskurt et al.). Le suivi quantitatif exact n'a pas été fait et la reproductibilité des paramètres microscopiques et de la quantité de globules rouges n'était pas constante à chaque échantillon sanguin de manière à pouvoir quantifier exactement les globules rouges avec un algorithme identifiant les contrastes de l'image. Visuellement, il était toutefois possible de comparer le ratio de globules marqués ou non en changeant l'éclairage selon l'absorption et l'émission du marqueur, tel qu'illustré à la figure 13 du chapitre 2. Nous nous sommes intéressés aux adaptations cardiaques et avons ajouté une étape de suivi longitudinal afin de mieux comprendre l'impact de l'hyperagrégation sur le contrôle de l'homéostasie.

Nos délais de sacrifice des animaux diffèrent aussi puisque les nôtres vont jusqu'à huit mois alors que les leurs sont de quatre jours. Nous garderons la porte ouverte à savoir si des dommages de l'endothélium auraient pu être renversés huit mois posttransfusion. Si c'est le cas, le muscle lisse ne semble pas quant à lui avoir récupéré ses fonctions initiales. Il y a bien sûr des avancements technologiques explorant la possibilité d'utiliser les cellules progénitrices circulantes en thérapie, mais il n'est pas prouvé hors de doutes que le remplacement des cellules endothéliales endommagées peut s'effectuer sans intervention (85).

Enfin, nous avons procédé à l'étude de la fonction endothéliale sur des vaisseaux du mésentère plutôt que sur des vaisseaux du muscle gracile. Les vaisseaux mésentériques sont un excellent modèle d'étude de la résistance périphérique et sont utilisés dans plusieurs études récentes (86, 87).

### **Réinterprétation des résultats obtenus par Baskurt et al. en fonction des conclusions de notre étude**

À la lumière de ces nuances mises en relief, nous proposons que les résultats obtenus par l'équipe de la Turquie soient dus à un biais expérimental introduit lors de la procédure de transfusion. Si l'axe du baroréflexe, important dans le contrôle de la pression, a été endommagé de façon mécanique suite à l'introduction des cathéters de transfusion, cela expliquerait pourquoi ils ont observé une augmentation rapide de la pression systolique de la queue permettant de conclure à une augmentation de la pression artérielle moyenne. En effet, non seulement la viscosité apparente du sang aurait été augmentée, mais les mécanismes de régulation de l'homéostasie auraient été endommagés. Nous croyons qu'un contrôle de plus avec du sang non traité aurait été nécessaire à leur étude, compte tenant des résultats que nous avons obtenus et du fait que le revêtement contrôle inhibe l'agrégation érythrocytaire et pourrait être suffisant pour contrebalancer les effets d'une décharge du baroréflexe.

Dans cette ligne d'idées, il faut garder en tête que le rôle principal de l'axe du baroréflexe est de maintenir la pression sanguine stable et que la vasodilatation et la diminution du débit cardiaque sont impliquées dans ce réflexe. L'étude du baroréflexe chez des rats conscients suggère que la variation de la pression provient surtout de la tension vasculaire plutôt que du rythme ou de la contraction cardiaque. D'ailleurs, la caractéristique la plus importante des animaux ayant subi une dénervation des afférences du baroréflexe est une augmentation de pression. Qui plus est, ces modèles de rats présentent une dysfonction endothéliale (14, 88). Nous suggérons donc que les conclusions de cette étude seraient différentes si la procédure de transfusion avait été conduite autrement, de façon à préserver les afférences du baroréflexe.

## ***PERSPECTIVES FUTURES***

Notre étude a permis d'étudier *in vivo* les mécanismes de régulation de la pression artérielle à l'aide de l'échographie chez le petit animal. Augmenter l'échantillonnage serait définitivement la première étape pour les perspectives futures. Un suivi quantitatif de la clairance des globules rouges marqués serait pertinents, ainsi qu'une évaluation vasculaire suite à un sacrifice quatre jours posttransfusion de manière à comparer les résultats avec ceux de Baskurt et al. Il faudrait aussi pousser plus loin l'analyse des modifications vasculaires entraînées. Il est moins commun d'étudier les adaptations morphologiques du muscle lisse lorsque l'endothélium est préservé. Une étude histologique des vaisseaux excisés, ainsi qu'une évaluation du tonus myogène, permettrait une confirmation de notre hypothèse. Nous avons pourtant ici un exemple où la fonction endothéliale semble être préservée, alors que le muscle lisse n'apparaît pas conserver ses fonctions physiologiques normales. Il serait donc intéressant de pousser l'étude au niveau cellulaire et moléculaire de façon à cerner les responsables pour la réponse anormale du muscle vasculaire lisse. D'abord, une quantification d'eNOS permettrait de voir si l'expression est augmentée et confirmerait une résistance du muscle lisse. Une étude vasculaire de la réponse myogénique nous donnerait des informations pour l'analyse de la mécanique vasculaire et une étude histologique permettrait de comparer les détails structuraux comme le diamètre de la lumière vasculaire et l'épaisseur de la paroi (89).

## SOURCES DOCUMENTAIRES

1. K.L.Dorrington and J.J. Pandit. The obligation role of the kidney in long-term arterial blood pressure control: extending Guyton's model of the circulation. *Anaesthesia*. 2009;64:1218-1228.
2. Michael J. Joyner, Nisha Charkoudian and B. Cunnar Wallin. A sympathetic view of the sympathetic nervous system and human blood pressure regulation. *Exp Physiol*. 2008;93(6):715-24.
3. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(1):16-26.
4. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev*. 2008;88(3):1009-86.
5. Zoccali C. The endothelium as a target in renal diseases. *J Nephrol*. 2007;20 Suppl 12:S39-44.
6. Baskurt, O. K. et al. Hemorheology et vascular control mechanisms. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2004;30:169-178.
7. Sylvia S. Mader. Biologie humaine. Chenelière education; 2009:467 p.
8. Shiels HA, White E. The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *J Exp Biol*. 2008;211(Pt 13):2005-13.
9. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*. 2009;3;54(19):1747-62.
10. Zang WJ, Zacharia J, Lamont C, Wier WG. Sympathetically evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in arterial smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(12):1515-25.
11. Patel S. Sodium balance-an integrated physiological model and novel approach. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009;20(4):560-9.

12. Lohmeir, T. E. et al. Recent Insights into the Interactions Between the Baroreflex and the Kidneys in Hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R828-836.
13. Joyner, M. J. Baroreceptor function during exercise: resetting the record. *Exp Physiol.* 2005;91: 27-36.
14. Wagner, C. D., B. Nafz et P. B. Person. Chaos in Blood Pressure Control. *Cardiovascular Research.* 1996;31:380-387.
15. Bourassa EA, Sved AF, Speth RC. Angiotensin modulation of rostral ventrolateral medulla (RVLM) in cardiovascular regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;29;302(2):167-75.
16. Osborn, J. W., F. Jacob et P. Guzman. A Neural Set Point for the Long-term control of Arterial Pressure : Beyond the Arterial Baroreceptor Reflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R846-R855.
17. Thrasher TN. Arterial baroreceptor input contributes to long-term control of blood pressure. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8(3):249-54.
18. Silvani A. Physiological sleep-dependent changes in arterial blood pressure: central autonomic commands and baroreflex control. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(9):987-94.
19. Cowley AW Jr, Liard JF, Guyton AC. Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. *Circ Res.* 1973;32(5):564-76.
20. McCubbin JW, Green JH, Page IH. Baroreceptor function in chronic renal hypertension. *Circ Res.* 1956;4(2):205-10.
21. Brooks, J. L. et A. F. Sved. Pressure to Change? Re-evaluating the Role of Baroreceptors in the Long-term Control of Arterial Pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R815-R818.
22. Lohmeier TE, Lohmeier JR, Haque A, Hildebrandt DA. Baroreflexes prevent neurally induced sodium retention in angiotensin hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(4):R1437-48
23. Lohmeier TE. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am J Hypertens.* 2001;14(6 Pt 2):147S-154S.

24. Lohmeier TE, Lohmeier JR, Warren S, May PJ, Cunningham JT. Sustained activation of the central baroreceptor pathway in angiotensin hypertension. *Hypertension*. 2002;39(2 Pt 2):550-6.
25. Osborn JW, Hornfeldt BJ. Arterial baroreceptor denervation impairs long-term regulation of arterial pressure during dietary salt loading. *Am J Physiol*. 1998;275(5 Pt 2):H1558-66.
26. Thrasher, T. N. Unloading arterial baroreceptors causes neurogenic hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282:R1044-R1053.
27. Seagard JL, Gallenberg LA, Hopp FA, Dean C. Acute resetting in two functionally different types of carotid baroreceptors. *Circ Res*. 1992;70(3):559-65.
28. Thrasher, T. N. Baroreceptors and the Long-term Control of Blood Pressure. *Exp Physiol*. 2004;89.4:3331-341.
29. Dickinson, C. J. Re: Baroreceptors and the Long-term Control of Blood Pressure. *Exp Physiol*. 2004;89.4:331-341.
30. Sleight, P. Arterial Baroreflexes can Determine Long-term Blood Pressure. *Exp Physiol*. 2004;89.4:331-341.
31. Ledingham JM. Sodium retention and volume expansion as mechanisms. *Am J Hypertens*. 1991;4(10 Pt 2):534S-540S.
32. Hall JE. Renal function in one-kidney, one-clip hypertension and low renin essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1991;4(10 Pt 2):523S-533S.
33. Kikuchi K, Iimura O, Yamaji I, Shibata S, Nishimura M, Aoki K, Nozawa A, Hasegawa T, Honma C, Kobayakawa H, et al. The pathophysiological role of water-sodium balance and renal dopaminergic activity in overweight patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1988;1(1):31-7.
34. Dunn, A. et S. Donnelly. The Role of the Kidney in Blood Volume Regulation: The Kidney as a Regulatory of the Hematocrit. *Am J Med Sci*. 2007;334(1):65-71.

35. Barrett, C. J. et al. What Sets the Long-term Level of Renal Sympathetic Nerve Activity: A Role for Angiotensin II and Baroreflexes? *Circ Res.* 2003;92:1330-1336.
36. Osborn JW. Hypothesis: set-points and long-term control of arterial pressure. A theoretical argument for a long-term arterial pressure control system in the brain rather than the kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(5-6):384-93.
37. Osborn JW, Jacob F, Guzman P. A neural set point for the long-term control of arterial pressure: beyond the arterial baroreceptor reflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(4):R846-55.
38. Chien, S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis : the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1209-1224.
39. White, C. R. et J. A. Frangos. The Shear stress of it all : The cell membrane and mechanochemical transduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2007;362:1459-1467.
40. Williams, B. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J. Hypertension.* 1998;16:1921-1929.
41. Li, Y. J., J. H. Haga et S. Chien. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J. Biomedich.* 2005;38:1949-1979.
42. Boisseau, M. R. Roles of mechanical blood forces in vascular diseases. A Clinical Overview. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2005;33:201-207.
43. Haga, J. H., Y. J. Li et S. Chien. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *Journal of Biomechanics.* 2007;40:947-960.
44. Hill, M. A. et al. Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Arteriolar Smooth muscle mechanotransduction: Ca<sup>2+</sup> signalling pathways underlying myogenic reactivity. *J. Appl. Physiol.* 2001;91:973-983.
45. Esper, R. J. et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology.* 2006;5:4.

46. Cines, D. B. et al. Endothelial cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood*. 1998;91:3527-3561.
47. Lehoux, S, et A. Tedgui. Bases cellulaires de la mécanotransduction dans la cellule endothéliale. *Médecine Sciences*. 2004;20:551-556.
48. Boo, Y. C. and H. Jo. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285:C499-C508.
49. Ziegler, T. , P. Silacci, V. J. Harrison and D. Hayoz. Nitric Oxide Synthase Expression in Endothelial Cells Exposed to Mechanical Forces. *Hypertension*. 1998;32:351-355.
50. Harrison, D. G. et al. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *Journal of Internal Medicine*. 2006;259:351-363.
51. Jerez, S., M. Peral et A. Coviello. Nitric Oxide modulates angiotensin II-induced endothelial vasoconstrictor prostanoid release. *European Journal of Pharmacology*. 2005;520:127-134.
52. [http://www.biochimie.univmontp2.fr/maitrise/reinhard/nos\\_intro.htm](http://www.biochimie.univmontp2.fr/maitrise/reinhard/nos_intro.htm)  
Consulté le 13 septembre 2008.
53. Anh Tuan Dinh-Xuan. Nobel 98: La part belle au NO. *Médecine/Science*. 1998;14 :1297-300.
54. Levine, Ruth R. Pharmacology Drug Actions and Reactions. Parthenon Publishing. Sixth edition. 2000;181-196.
55. P. C. Johnson, J. J. Bishop, S. Popel and M. Intaglietta. Effects of red cell aggregation on the venous microcirculation. *Biorheology*. 199;36:457-460.
56. Meiselman HJ, Neu B, Rampling MW, Baskurt OK. RBC aggregation: laboratory data and models. *Indian J Exp Biol*. 2007;45(1):9-17.
57. Forconi, S. From hyperviscosity to endothelial dysfunction : a return trip? *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2004;30:155-165.
58. Katritsis D, Kaiktsis L, Chaniotis A, Pantos J, Efstathopoulos EP, Marmarelis V. Wall shear stress: theoretical considerations and methods of measurement. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007;49(5):307-29.

59. Kleinstreuer C. et al. Hemodynamic parameters and early intimal thickening in branching blood vessels, *Crit Rev Biomed Eng.* 2001;29(1):1-64.
60. Reneman RS, Arts T, Hoeks AP. Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory. *J Vasc Res.* 2006;43(3):251-69.
61. Bishop, J. J. et al. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280: H222-H236.
62. Martini J, Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Mechanotransduction and the homeostatic significance of maintaining blood viscosity in hypotension, hypertension and haemorrhage. *J Intern Med.* 2006;259(4):364-72.
63. Secomb, T.W. and A. R., Pries. Rheology of the microcirculation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2003;29:143-148.
64. Pries, A. R. et al. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *Am J Physiol.* 1997;273:H2272-H2279.
65. Baskurt, O. K. et al. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H222-H229.
66. Cloutier G, Qin Z, Durand LG, Teh BG. Power Doppler ultrasound evaluation of the shear rate and shear stress dependences of red blood cell aggregation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1996;43(5):441-50.
67. Behmoaras J, Osborne-Pellegrin M, Gauguier D, Jacob MP. Characteristics of the aortic elastic network and related phenotypes in seven inbred rat strains. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(2):H769-77.
68. [http://www.io-one.fr/rap/volume\\_sanguin.pdf?PHPSESSID=82ebf67fe73f28c92d99329f32dcd76c](http://www.io-one.fr/rap/volume_sanguin.pdf?PHPSESSID=82ebf67fe73f28c92d99329f32dcd76c) Consulté le 15 octobre 2008.
69. Hunt, E. et J. S. Moore. Use of blood and blood products. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1990;6:1:133-47.
70. Armstrong JK, Meiselman HJ, Wenby RB, Fisher TC. Modulation of red blood cell aggregation and blood viscosity by the covalent attachment of Pluronic copolymers. *Biorheology.* 2001;38(2-3):239-47.

71. Armstrong, J. K., H. J. Meiselman, R. B. Wenby et T. C. Fisher. Modulation of red blood cell aggregation and blood viscosity by the covalent attachment of Pluronic copolymers. *Biorheology*. 2001;38: 239-247.
72. Eitenmüller, Inka et al. The Range of Adaptation by Collateral Vessels After Femoral Artery Occlusion. *Circulation Research*. 2006;15;99(6):656-62.
73. Weber, R. S., N. Jabbour et R. C. G. Martin II. Anemia and Transfusions in Patients Undergoing Surgery for Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2007. 15:1:34-45.
74. Krege, J. H. et al. A Noninvasive Computerized Tail-Cuff System for Measuring Blood Pressure in Mice. *Hypertension*. 1995. 25(5):1111-1115.
75. El-Mas, M. M. et A. A. Abdel-Rahman. Longitudinal studies on the effect of hypertension on circadian hemodynamic and autonomic rhythms in telemetered rats. *Life Sciences*. 2005;76:901-915.
76. American Society of Echocardiography. Recommendations for Quantitation of the Left Ventricle by Two-Dimensional Echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 1989;2(5):358-367.
77. Vassalli, G. et al. Microvascular dysfunction and myocardial ischemia. *Rev Med Suisse*. 2008. 18:4:1521-5.
78. Török J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol Res*. 2008;57:6:813-25.
79. Weytjens, C. et al. Influence of Heart Rate Reduction on Doppler Myocardial Imaging Parameters in a Small Animal Model. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2008;35: 30-35.
80. Luecke, T. et P. Pelosi. Clinical review : Positive end-expiratory pressure and cardiac output. *Critical Care*. 2005;9:607-621.
81. Bombardini, T. Myocardial contractility in the echo lab: molecular, cellular and pathophysiological basis. *Cardiovascular Ultrasound*. 2005;3:27.
82. Mingorance, C. et al. Effects of Chronic Treatment With the CB<sub>1</sub> Antagonist, Rimonabant on the Blood Pressure, and Vascular Reactivity of Obese Zucker Rats. *Obesity*. 2009;17(7):1340-7.

83. Kim, H. R. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J. Cell. Mol. Med.* 2008;12:2165-2180.
84. Martinez-Lemus, Luis A., Hill, Michael A. and Meiniger, Gerald A. The Plastic Nature of the Vascular Wall: A Continuum of REmodeling Events Contributing to Control of Arteriolar Diameter and Structure. *Physiology.* 2008;24:45-57.
85. Povsic TJ, Goldschmidt-Clermont PJ. Endothelial progenitor cells: markers of vascular reparative capacity. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008 Jun;2(3):199-213.
86. Belin de Chantemèle EJ, Vessières E, Guihot AL, Toutain B, Loufrani L, Henrion D. Cyclooxygenase-2 preserves flow-mediated remodeling in old obese Zucker rat mesenteric arteries. *Cardiovasc Res.* 2009
87. Hilgers RH, Janssen GM, Fazzi GE, De Mey JG. 24 Hour Exposure to Altered Blood Flow Modifies Endothelial Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Rat Mesenteric Arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009
88. Su D.F et Miao Chao-Yu. Arterial baroreflex function in conscious rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(8):673-679.
89. Sonoyama K, Greenstein A, Price A, Khavandi K, Heagerty T. Vascular remodeling: implications for small artery function and target organ damage. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2007 Dec;1(2):129-37.

## ANNEXE

### MODE DE CALCUL VEVO 770

B-Mode Calculations	Formula	Units	View S
Epicardial Vol; d (Epicardial Volume; Diastole) Formula Legend: Ep=Epicardial	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{EpMajor; d}{2} \times \left[ \frac{EpArea; d}{\pi \left( \frac{EpMajor; d}{2} \right)} \right]^2$	$\mu l$	Epi
Epicardial Vol; s (Epicardial Volume; Systole) Formula Legend: Ep=Epicardial	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{EpMajor ; s}{2} \times \left[ \frac{EpArea ; s}{\pi \left( \frac{EpMajor ; s}{2} \right)} \right]^2$	$\mu l$	Epi
Epicardial SV (Epicardial Stroke Volume)	$Epicardial Vol; d - Epicardial Vol; s$	$\mu l$	Epi
Epicardial %EF (Epicardial Percent	$\frac{EpicardialSV}{EpicardialVol;d} \times 100$	%	Epi

Ejection Fraction)					
Epicardial %FAC (Epicardial Percent Fractional Area Change)	$\frac{\text{EpicardialArea; d} - \text{EpicardialArea; s}}{\text{EpicardialArea; d}} \times 100$	%	Epi		
Epicardial Area Change	$\text{Epicardial Area; d} - \text{EpicardialArea; s}$	mm <sup>2</sup>	Epi		
Epicardial CO (note 1) (Epicardial Cardiac Output)	$\frac{\text{EpicardialSV}}{2} \times \text{HeartRate}$	μl/min	Epi		
LV Vol; d (Left Ventricle Volume; Diastole)	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{\text{LVMajor ; s}}{2} \times \left[ \frac{\text{LVArea ; d}}{\pi \left( \frac{\text{LV Major ; d}}{2} \right)} \right]^2$	μl	A2C, A4C		
LV Vol; s (Left Ventricle Volume; Systole)	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{\text{LV Major ; s}}{2} \times \left[ \frac{\text{LV Area ; s}}{\pi \left( \frac{\text{LV Major ; s}}{2} \right)} \right]^2$	μl	A2C, A4C		
LV SV (Left Ventricle Stroke Volume)	$\text{LV Vol; d} - \text{LV Vol; s}$	μl	A2C, A4C		
LV %EF (Left Ventricle Percent Ejection Fraction)	$\frac{\text{LVSV}}{\text{LVVol; d}} \times 100$	%	A2C, A4C		
LV %FAC (Left Ventricle Percent Fractional Area Change)	$\frac{\text{LVArea; d} - \text{LVArea; s}}{\text{LVArea; d}} \times 100$	%	A2C, A4C		

Fractional Area Change)				
LV Area Change (Left Ventricle Area Change)	$LV\ Area; d - LV\ Area; s$		$mm^2$	A2C, A4C
LV CO (note 1) (Left Ventricle Cardiac Output)	$LV\ SV \times Heart\ Rate$		$\mu l/min$	A2C, A4C
RV Vol; d (Right Ventricle Volume; Diastole)	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{RVMajor;d}{2} \times \left[ \frac{RVArea;d}{\pi \left( \frac{RVMajor;d}{2} \right)} \right]^2$		$\mu l$	A2C, A4C
RV Vol; s (Right Ventricle Volume; Systole)	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{RV\ Major ;s}{2} \times \left[ \frac{RV\ Area ;s}{\pi \left( \frac{RV\ Major ;s}{2} \right)} \right]^2$		$\mu l$	A2C, A4C
RV SV (Right Ventricle Stroke Volume)	$RV\ Vol; d - RV\ Vol; s$		$\mu l$	A2C, A4C
RV %EF (Right Ventricle Percent Ejection Fraction)	$\frac{RVSV}{RVVol;d} \times 100$		%	A2C, A4C
RV %FAC (Right Ventricle Percent Fractional Area Change)	$\frac{RVArea;d - RVArea;s}{RVArea : d} \times 100$		%	A2C, A4C

RV Area Change (Right Ventricle Area Change)	$RV\ Area; d - RV\ Area; s$	$mm^2$	A2C, A4C
RV CO (note 1) (Right Ventricle Cardiac Output)	$RV\ SV \times Heart\ Rate$	$\mu l/min$	A2C, A4C
Percent Aortic Stenosis 1	$100 \times (Residual\ Lumen1 / Aorta\ Area1)$	%	A2C, A4C
Percent Aortic Stenosis 2	$100 \times (1 - Residual\ Lumen2 / Aorta\ Area\ 2)$	%	A2C, A4C
Percent Aortic Stenosis 3	$100 \times (1 - Residual\ Lumen\ 3 / Aorta\ Area\ ))$	%	A2C, A4C
LV %FS (Left Ventricle Percent Fractional Shortening)	$100 \times (1 - LV\ ES; s\ LV\ ED; d.)$	%	PLA
Endocardial Vol; d	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{EndMajor ; d}{2} \times \left[ \frac{EndArea ; d}{\pi \left( \frac{EndMajor ; d}{2} \right)} \right]^2$	$\mu l$	Endo
Endocardial Vol; s	$\frac{4\pi}{3} \times \frac{EndMajor ; s}{2} \times \left[ \frac{EndArea ; s}{\pi \left( \frac{EndMajor ; s}{2} \right)} \right]^2$	$\mu l$	Endo
Endocardial SV (Endocardial Stroke Volume)	$Endocardial\ Vol; d - Endocardial\ Vol; s$	$\mu l$	Endo

Endocardial %EF	$\frac{\text{EndocardialSV}}{\text{EndocardialVol};d} \times 100$	%	Endo
Endocardial %FAC	$\frac{\text{EndocardialArea};d - \text{EndocardialArea};s}{\text{EndocardialArea};d} \times 100$	%	Endo
Endocardial Area Change	$\text{EndocardialArea};d - \text{EndocardialArea};s$	mm <sup>2</sup>	Endo
Endocardial CO (note 1)	$\frac{\text{EndocardialSV}}{2} \times \text{HeartRate}$	μl/min	Endo
B (Average LV Radius)	$\sqrt{\frac{(\text{LVAreaEndocardialBorder};d)}{\pi}}$	mm	LV Mass
T (Average Wall Thickness, uncorrected)	$\sqrt{\frac{(\text{LVAreaEpicardialBorder};d)}{\pi}} - \sqrt{\frac{(\text{LVAreaEndocardialBorder};d)}{\pi}}$	mm	LV Mass
AWT; d (Average Wall Thickness, Diastole)	$\frac{\sqrt{(\text{LVAreaEpicardialBorder};d)} - \sqrt{(\text{LVAreaEndocardialBorder};d)}}{\sqrt{\left(\frac{\text{LVAreaEndocardialBorder};d}{\pi}\right)}}$		LV Mass
LV Mass	$1.05 \times \left(\frac{5}{6}\right) \times \text{LVAEPI} \times (\text{LVL};d + T) - \left(\frac{5}{6} \times \text{LVAEND} \times \text{LVL};d\right)$	mg	LV Mass
Simpson 1 Volume; d			

---


$$\left( (Simpson1Area1;d + Simpson1Area2;d + Simpson1Area3;d) \times \frac{Simpson1Length;d}{4} \right)$$

$$+ \left( \left( \frac{Simpson1Length;d}{\frac{4}{2}} \right) \times Simpson1Area4;d \right)$$

$$+ \left( \frac{\pi}{6} \times \left( 4 \frac{Simpson1Length;d}{4} \right)^3 \right)$$


---

Simpson 1 Volume; s

$$\left( (Simpson1Area1;s + Simpson1Area2 : s + Simpson1Area3 : s) \times \frac{Simpson1Length;s}{4} \right)$$

$$+ \left( \left( \frac{Simpson1Length;s}{\frac{4}{2}} \right) \times Simpson1Area4;s \right)$$

$$+ \left( \frac{\pi}{6} \times \left( \frac{Simpson1Length;s}{4} \right)^3 \right)$$


---

Simpson 1 SV  
(Simpson 1 Stroke  
Volume)

*Simpson1 Volume; d - Simpson1 Volume; s*

$\mu l$     **Simp**

---

Simpson 1 %EF (Simpson 1 Ejection Fraction)	$\frac{Simpson1SV}{Simpson1Volume;d} \times 100$	%	Simp
Simpson 1 %FAC (Simpson 1 Fractional Area Change)	$\frac{Simpson1Area2 : d - Simpson1Area2;s}{Simpson1Area2;d} \times 100$	%	Simp
Simpson 1 CO (note 1)	$Simpson1 SV \times Heart Rate$	$\mu l/min$	Simp
Simpson 2 Volume; d			
$\left( (Simpson2Area1;d + Simpson2Area2;d + Simpson2Aea3;d) \times \frac{Simpson2Length;d}{4} \right)$ $+ \left( \left( \frac{Simpson2Length;d}{4} \right) \times Simpson2Area4;d \right)$ $+ \left( \frac{\pi}{6} \times \left( \frac{Simpson2Length;d}{4} \right)^3 \right)$			
Simpson 2 Volume; s			

$$\left( (Simpson2Area1;s + Simpson2Area2;s + Simpson2Area3;s) \times \frac{Simpson2Length;s}{4} \right) + \left( \left( \frac{Simpson2Length : s}{\frac{4}{2}} \right) \times Simpson2Area4;s \right) + \left( \frac{\pi}{6} \times \left( \frac{Simpson2Length;s}{4} \right)^3 \right)$$

Simpson 2 SV (Simpson 2 Stroke Volume)	$Simpson2 \text{ Volume}; d - Simpson 2 \text{ Volume}; s$	$\mu l$	Simp
Simpson 2 %EF (Simpson 2 Ejection Fraction)	$\frac{Simpson2SV}{Simpson2Volume;d} \times 100$	%	Simp
Simpson 2 %FAC (Simpson 2 Fractional Area Change)	$\frac{Simpson2Area2;d - Simpson2Area2;s}{Simpson2Area2;d} \times 100$	%	Simp
Simpson 2 CO (note 1)	$Simpson2 SV \times Heart Rate$	$\mu l/min$	Simp
Simpson 3 Volume; d			

---


$$\left( (Simpson3Area1;d + Simpson3Area2;d + Simpson3Area3;d) \times \frac{Simpson3Length;d}{4} \right)$$

$$+ \left( \left( \frac{Simpson3Length;d}{4} \right) \times Simpson3Area4;d \right)$$

$$+ \left( \frac{\pi}{6} \times \left( \frac{Simpson3Length;d}{4} \right)^3 \right)$$


---

Simpson 3 Volume; s

$$\left( (Simpson3Area1;s + Simpson3Area2;s + Simpson3Area3;s) \times \frac{Simpson3Length;s}{4} \right)$$

$$+ \left( \left( \frac{Simpson3Length;s}{4} \right) \times Simpson3Area4;s \right)$$

$$+ \left( \frac{\pi}{6} \times \left( \frac{Simpson3Length;s}{4} \right)^3 \right)$$


---

Simpson 3 SV  
(Simpson 3 Stroke Volume)

*Simpson 3 Volume; d – Simpson 3 Volume; s*

$\mu l$

Simp

---

Simpson 3 %EF (Simpson 3 Ejection Fraction)	$\frac{Simpson3SV}{Simpson3Volume;d} \times 100$	%	Simp
Simpson 3 %FAC (Simpson 3 Fractional Area Change)	$\frac{Simpson3Area2;d * Simpson3Area2;s}{Simpson3Area2;d} \div 100$	%	Simp
Simpson 3 CO (note 1)	$Simpson\ 3\ SV \times Heart\ Rate$	$\mu l/min$	Simp