

Concours externe de recrutement de personnel ITRF Session 2006 Assistant ingénieur de Recherche et de Formation BAP A Emploi type :Assistant en expérimentation animale Epreuve écrite d'admissibilité Durée de l'épreuve 3 heures – coefficient 4	Etablissement organisateur : INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE 2, avenue de la Forêt de Haye 54501 VANDOEUVRE LES NANCY
--	---

Note aux candidats : Votre identité ne doit figurer que dans la partie supérieure de la bande en-tête des copies modèle C que vous utiliserez. Toute autre mention de votre identité ou signature entraînera l'annulation de votre épreuve.

En tant que responsable de la prise en charge technique des protocoles expérimentaux dans une équipe de recherche, vous devez prendre connaissance du projet expérimental décrit dans l'extrait d'article scientifique ANNEXE I (résumé, introduction, matériel et méthodes) :

Vous rédigerez un mode opératoire correspondant à votre participation à ce projet, aussi bien à Lyon qu'à Nancy, en considérant que vous allez devoir préparer les animaux, observer leur comportement, les anesthésier, effectuer les opérations courantes de chirurgie, réaliser des prélèvements, gérer le bon déroulement des expériences décrites dans l'article et consigner les données obtenues.

En utilisant vos connaissances générales et en biologie animale (physiologie, anatomie, comportement, ...), vous vous attacherez à décrire votre rôle dans les domaines suivants :

- l'application de la réglementation liée à l'expérimentation animale,
 - la manipulation et le suivi des animaux avant, pendant et après les protocoles expérimentaux,
 - l'établissement des conditions nécessaires à un bon déroulement des expériences,
 - l'inscription dans une démarche qualité.
-

ANNEXE I

L'ANNÉE GÉRONTOLOGIQUE 2003 ©

IMPACT DE L'EXERCISE PHYSIQUE SUR LA MÉCANIQUE, LA STRUCTURE ET LA COMPOSITION DE LA PAROI AORTIQUE, ET SUR LES PERFORMANCES ET LA MASSE CARDIAQUES CHEZ DES RATS ÂGÉS

N. NIEDERHOFFER¹, I. LARTAUD-IDJOUADIENE¹, D. DESPLANCHES², P. GIUMMELLY¹, J. ATKINSON¹

1. Cardiovascular Research Group, EA 3448, Henri Poincaré University, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy,
2. CNRS UMR 5123, Université Claude Bernard, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France,
Auteur pour correspondance : Jeffrey Atkinson, Cardiovascular Research Group, EA 3448, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France. Téléphone: (33) 383 68 22 62; Fax: (33) 383 68 23 01, Email: atkinson@pharma.uhp-nancy.fr ; Ce travail a été financé par la Fondation "CNP Sport et Santé" (CNP, Paris, France), LIPHA Pharmaceutical Company (Lyon, France) et le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (Paris, France; EA3448), le Conseil Régional de Lorraine (Metz, France) et la Communauté Urbaine du Grand Nancy (Nancy, France) et l'Association Pharmacolor (Nancy, France). L'adresse de Nathalie Niederhoffer est: Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin ; BP 24, 67401 ILLKIRCH Cedex.

Résumé : Chez les sujets âgés, même en dehors de toute pathologie, le bénéfice cardiovasculaire apporté par l'entraînement physique reste discuté. Nous avons voulu évaluer l'impact d'un entraînement physique de 6 semaines (course sur tapis roulant) sur les propriétés élastiques de la paroi aortique, ainsi que sur la masse et la performance cardiaques chez des rats normotendus âgés de 18 mois. Plusieurs indices de rigidité de la paroi aortique ont été mesurés, chez l'animal conscient non restreint : (1) le module élastique - calculé à partir de la vitesse de transmission de l'onde de pouls et des dimensions artérielles, (2) l'amplification thoraco-abdominale de la pression pulsatile, (3) la fonction de transfert, et (4) les ondes de réflexion, et enfin, chez le rat déméduillé soumis à une perfusion de phényléphrine: (5) la pente de la courbe obtenue entre la vitesse de transmission de l'onde de pouls thoracoabdominale et la pression artérielle moyenne. La géométrie de l'aorte thoracique (diamètre interne et épaisseur médiale) et la composition de la paroi (taux de calcium et de desmosine + isodesmosine), ont été évaluées. L'adaptation cardiaque après 6 semaines d'exercice a été évaluée d'après la fréquence cardiaque et le travail cardiaque estimé, au repos, et d'après le rapport poids du ventricule gauche sur poids corporel. Deux des six rats entraînés sont morts avant la fin de la période d'entraînement, alors que tous les rats témoins survécurent. Sur les 4 rats entraînés restants, l'exercice n'eut aucun impact sur la géométrie aortique ni sur les propriétés élastiques ou la composition de la paroi aortique. La fréquence cardiaque, le travail cardiaque estimé et la pression aortique pulsatile ont diminué, sans modification de la pression artérielle moyenne. L'exercice physique induisit une hypertrophie ventriculaire gauche. En conclusion, l'exercice physique chez les rats âgés ne modifie pas les propriétés élastiques de la paroi aortique ni la pression artérielle moyenne. Cependant, bien que l'impédance vasculaire et les résistances ne soient apparemment pas augmentées, le travail cardiaque diminue et une hypertrophie ventriculaire gauche apparaît. Ainsi, l'exercice physique chez les rats âgés, auparavant sédentaires, conduit à une altération de la performance cardiaque au repos. Certains animaux ne survivent pas aux conditions d'exercice.

Mots clés : Âge, rigidité aortique, hypertrophie ventriculaire gauche.

INTRODUCTION

La compliance aortique correspond à l'effet Windkessel qui permet d'amortir le débit cardiaque intermittent pour le transformer en un débit plus continu au niveau tissulaire. L'aorte thoracique emmagasine jusqu'à 50% du volume d'éjection systolique pendant la systole, et la restitution diastolique des parois aortiques contribue pour 50% à l'écoulement du flux pendant la diastole. Ce mécanisme reste intact jusqu'à environ 60 ans chez l'Homme : jusqu'à cet âge, la compliance

aortique varie peu, puisque la perte progressive des propriétés élastiques de la paroi aortique est compensée par une dilatation et une élongation qui augmentent le volume aortique [1, 2].

Après 60 ans, l'augmentation de la rigidité pariétale aortique devient proportionnellement plus importante que l'augmentation de volume, et la compliance aortique diminue [1]. La diminution de compliance aortique augmente la contrainte ventriculaire télésystolique, qui devient un élément important dans la survenue d'hypertrophie ventriculaire gauche et d'insuffisance cardiaque [3]. Ces phénomènes pourraient expliquer pourquoi l'augmentation de la rigidité pariétale aortique est liée à l'augmentation de la mortalité chez les sujets âgés [4]. Les interventions, pharmacologiques ou non, susceptibles de diminuer la rigidité de la paroi aortique pourraient donc avoir des impacts bénéfiques sur la fonction et la structure cardiaques, et ainsi, sur la morbidité et la mortalité [5]. Un des moyens de diminuer la rigidité pariétale aortique est de réduire la pression de distension intraluminale, par exemple en utilisant des traitements antihypertenseurs. Cette approche n'est pas optimale chez les sujets âgés en raison des risques de diminution de la pression diastolique et donc de la perfusion coronaire. Une intervention visant à réduire la pression aortique pulsatile (en diminuant la rigidité pariétale aortique) sans modification de la pression moyenne serait plus satisfaisante, puisqu'elle réduirait la pression aortique systolique (et donc la post-charge cardiaque) mais pas la pression diastolique (ni la perfusion coronaire). Nous avons préalablement montré que des changements de pression aortique pulsatile (sans modification de la pression moyenne) pouvaient être obtenus expérimentalement suite à des modifications de la composition de la paroi aortique [6-9].

L'augmentation progressive de la rigidité pariétale aortique avec l'âge (indépendamment de toute modification de la pression artérielle moyenne) [10] est lié à un processus d'artériosclérose (défini comme une dégénérescence diffuse de la média aortique, liée à l'âge, qui survient indépendamment de tout processus d'athérosclérose, [11, 12]). Ce processus de dégénérescence est caractérisé par une accumulation de calcium sur les fibres élastiques, avec amincissement, fragmentation et rupture de ces mêmes fibres : c'est le processus d'élastocalcinose [12, 13]. L'évolution de ce processus semble apparemment être modifié par l'exercice physique puisque Matsuda et coll. [14] montrent que la nage forcée chez de jeunes rats augmente le contenu en élastine de la paroi aortique, diminue le taux de calcium sur les fibres élastiques et réduit le module élastique incrémental de la paroi aortique.

Notre hypothèse de travail est que chez les rats vieillissants, l'exercice physique (6 semaines de course sur tapis roulant) pourrait avoir un effet bénéfique sur la rigidité de la paroi aortique et ainsi sur la structure et la performance cardiaques. La rigidité pariétale aortique a été évaluée chez le rat conscient non restreint, en utilisant (a) le module élastique calculé à partir de la vitesse de transmission de l'onde de pouls (VOP), (b) l'amplification thoraco-abdominale de la pression pulsatile [1, 8], (c) la fonction de transfert après transformation de Fourier des signaux de pression aortique thoracique et abdominal [2], et (d) l'étude des ondes de réflexion [2]. Enfin, les changements pression indépendants de la rigidité pariétale aortique ont été évalués chez le rat démyéliné soumis à une perfusion de phényléphrine par (e) la pente de la courbe obtenue entre la VOP thoraco-abdominale et la pression aortique moyenne [8, 15]. Les changements de composition de la paroi aortique ont été évalués par détermination des taux de calcium et des acides aminés de pontage spécifiques de l'élastine (la desmosine et l'isodesmosine). L'adaptation myocardique à l'entraînement a été appréciée en mesurant la fréquence cardiaque et en estimant le travail cardiaque au repos, et en mesurant la masse ventriculaire gauche.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux et entraînement physique

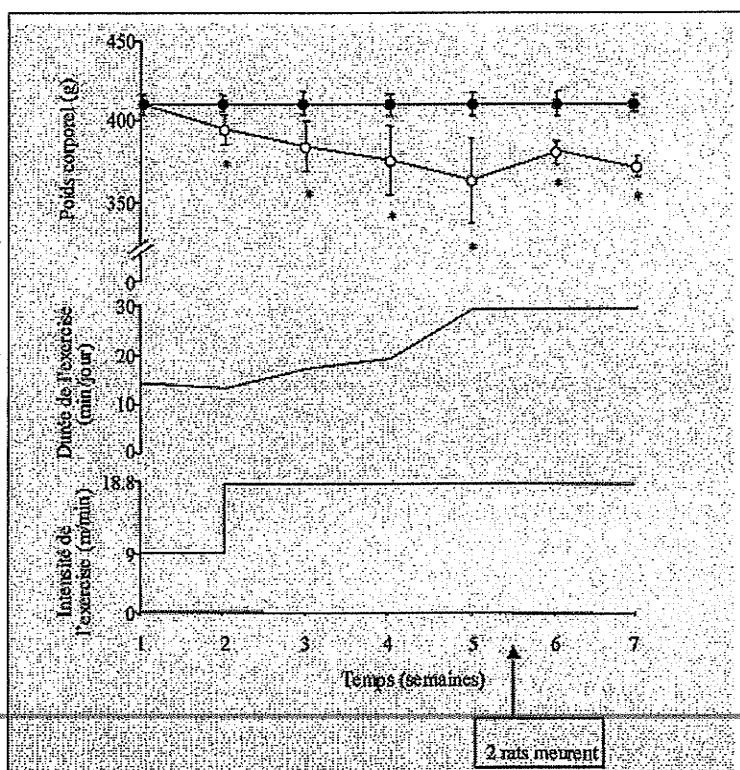
Treize rats normotendus Wistar WAG/Rij âgés de 18 mois (411 ± 6 g; Centre d'Etudes Atomiques de Saclay, Gif-sur-Yvette, France), élevés dans des conditions standard (température: 22 ± 2 °C; humidité: 50 ± 10 %; lumière de 7 à 19h) ont reçu une diète normale et de l'eau adoucie à volonté.

Deux groupes ont été constitués : 7 rats sont restés sédentaires, 6 rats ont subi l'entraînement physique.

L'entraînement physique a été réalisé à Lyon. Il a consisté en une course sur tapis roulant entraîné par un moteur électrique (Gymrol S.A., 63000 St Etienne, France) à environ 70 % de la VO₂max (extrapolée à partir des données de Shepherd et Gollnick, [16]): pendant les 4 premières semaines, l'intensité et la durée des séances d'exercice ont été augmentées progressivement de 9 à 19 m/min et de 10 à 30 min/jour. Ce schéma d'entraînement (19 m/min, 30 min/jour) a été poursuivi pendant les 2 semaines suivantes. Il y a eu 2 morts durant les séances d'exercice au cours de la 5^{ème} et de la 6^{ème} semaines. Au cours des 6 semaines d'entraînement, les 4 rats survivants ont perdu 9±1 % de leur poids corporel (Figure 1, 373±6 g le jour des mesures hémodynamiques), alors que le poids corporel des rats témoins n'a pas changé (413±5 g, P < 0,05).

Les animaux ont été transférés à Nancy, où les mesures hémodynamiques ont été réalisées entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour suivant la fin de l'entraînement physique, ou la semaine suivante pour les rats témoins. Les expériences ont été réalisées en accord avec les recommandations du Ministère de l'Agriculture (Cardiovascular Research Group, EA 3448 : permis n° 54-5 et 03575 ; CNRS UMR 5123, permis n° 1544).

Figure 1 : Représentation schématique du protocole d'entraînement physique de 6 semaines (course sur tapis roulant) montrant l'évolution du poids corporel chez les rats âgés témoins (sédentaires, cercles pleins) et entraînés (cercles ouverts), la durée (min/jour) et l'intensité (m/min) de l'exercice. *: P < 0.05, rats entraînés versus témoins



Mesure de la pression aortique, de l'amplification de la pression pulsatile, de la vitesse de transmission de l'onde de pouls, de la fonction de transfert et des ondes de réflexion chez le rat conscient, non restreint

Des cathéters de polyéthylène (0,96/0,58 mm diamètre externe/diamètre interne) ont été implantés de façon chronique sous anesthésie à l'halothane (2% dans l'oxygène) dans l'aorte thoracique descendante, l'aorte abdominale et la veine cave abdominale [8, 10, 15, 17]. Les rats entraînés ont perdu 4±1% et les rats témoins 3±1% de leur poids corporel pendant la période de récupération post-chirurgicale (24h) ; un rat témoin est mort d'hémorragie carotidienne en cours de chirurgie.

Vingt-quatre heures après, les cathéters aortiques des rats conscients, non restreints sont connectés aux capteurs de pression à faible volume (réponse en fréquence plate avec un déphasage $< - 6^\circ$ jusqu'à 30 Hz, [8]). Les signaux de pression sont convertis sous forme digitale et enregistrés en continu à une fréquence d'échantillonnage de 256 Hz. Après une période d'adaptation du rat à son nouvel environnement, les paramètres de base sont déterminés battement par battement sur une période de 4 secondes toutes les 30 secondes pendant 30 min. Un algorithme détecte les valeurs maximales et minimales de chaque signal de pression, calcule la pression aortique moyenne (mm Hg, à partir de la surface sous la courbe), la pression pulsatile (différence diastolo-systolique) et la fréquence cardiaque (bpm, nombre de cycles pendant la période de 4 secondes).

La VOP (cm/s) est calculée comme la distance séparant les 2 extrémités des cathéters - mesurée in situ par accollement d'un fil de coton sur le trajet aortique, après fixation pressurisée post-mortem du réseau artériel (rats entraînés $8,6 \pm 0,1$ cm; témoins $8,3 \pm 0,1$ cm, $P > 0,05$) - divisée par le temps nécessaire à l'onde de pouls pour parcourir cette distance. Le délai de transmission de l'onde de pouls (ms) est mesuré en continu par un algorithme qui déplace dans le temps le train d'ondes de pression abdominale jusqu'à superposition optimale (obtention de la meilleure corrélation entre les 2 signaux) sur le train d'ondes de pression thoracique [8, 10, 15, 17].

La VOP a été utilisée pour calculer le module élastique de la paroi aortique (corrigé pour la contrainte pariétale, cf infra) et la rigidité isobarique, définie comme la pente de la courbe reliant VOP et pression aortique moyenne centrale (enregistrée au niveau thoracique, PAMc) (cf infra).

Un 3^{ème} indice de rigidité pariétale aortique est l'amplification thoracoabdominale de la pression pulsatile, déterminée comme le rapport de la pression aortique pulsatile abdominale sur la pression aortique pulsatile thoracique. L'amplification thoraco-abdominale reflète l'augmentation progressive de la pression pulsatile des sites centraux vers les sites périphériques : elle diminue avec l'augmentation de la rigidité de la paroi aortique [2].

Un 4^{ème} indice est la fonction de transfert de pression. Une analyse de Fourier des signaux enregistrés aux sites thoracique et abdominal est réalisée (pour une valeur de pression artérielle moyenne de 100 mmHg, niveau inférieur à la moyenne de PAMc dans les 2 groupes de rats, choisi pour que chaque rat puisse être inclus dans l'analyse). Le spectre d'amplitude est réalisé sur les 5 premières harmoniques, et la fonction de transfert, définie comme le rapport entre l'amplitude du signal de pression abdominale sur l'amplitude du signal de pression thoracique à chaque harmonique, est représenté en fonction des harmoniques. Cette relation est déplacée vers le haut et décalée vers de plus hautes valeurs de fréquences lors d'une augmentation de la rigidité pariétale aortique [2].

Une augmentation de la rigidité de la paroi aortique conduit à une surestimation de la pression systolique par amplification des ondes de réflexion. Le signal de pression thoracique a donc été analysé selon la méthode décrite par Murgo et coll. [18]. Quatre-vingt dix % des signaux étaient de la forme A définie par Murgo et coll. [18]. La hauteur entre l'épaule de l'onde réfléchie et le pic systolique (DP, mmHg), l'index d'augmentation ($= DP / \text{pression pulsatile, } \%$), le temps de transit de l'onde de réflexion (Dt = temps séparant le pied du signal de pression de l'épaule de l'onde de réflexion, ms) et le temps d'éjection ventriculaire (TEV = temps séparant le pied du signal de pression de l'incisura diastolique, ms) ont été calculés sur une période de 1 seconde (6 battements cardiaques) et moyennés.

La fréquence cardiaque est dérivée du signal de pression aortique thoracique ; le travail cardiaque est estimé par l'équation "fréquence cardiaque x pression aortique systolique thoracique".

Relation VOP - PAMc chez le rat déméduillé

Après les mesures hémodynamiques chez le rat éveillé, les animaux sont anesthésiés (halothane (2%)/oxygène), déméduillés et immédiatement ventilés (1,2 ml 100 g-1, 50 coups par minute) selon le même protocole que celui utilisé lors d'une autre étude sur l'impact de l'exercice physique chez des rats jeunes [17]. Les rats sont ensuite perfusés en continu par des doses croissantes de phényléphrine [8, 17] de façon à augmenter progressivement leur PAMc jusqu'aux valeurs mesurées précédemment à l'état éveillé. La VOP (variable dépendante) est exprimée en fonction de la PAMc

(variable indépendante) en utilisant un modèle linéaire. Les valeurs de pente et d'intersection obtenues pour chaque rat sont traitées comme des valeurs paramétriques indépendantes et sont moyennées. Nous avons déjà rapporté que la pente de la courbe VOP / PAMc augmente suite à des changements de la composition de la paroi aortique, responsables d'une augmentation pression indépendante de la rigidité intrinsèque de la paroi aortique [8, 9, 15, 17].

Géométrie aortique, contrainte pariétale, module élastique et composition de la paroi aortique, masse cardiaque

Les animaux sont sacrifiés par arrêt de la ventilation et perfusés à leur valeur basale de PAMc (mesurée chez l'animal éveillé) par une solution de formol 10% v/v tamponnée. Un cm d'aorte thoracique descendante (le plus proche de la crosse aortique) est prélevé et inclut dans la paraffine. Trois coupes de 20 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline-éosine pour la mesure du diamètre interne (D_i , mm, délimité par la lame limitante élastique interne) et de l'épaisseur de la paroi (h , μm , définie comme la distance entre les lames limitantes élastiques interne et externe) (Saisam @, Microvision Instruments, Evry, France) ; chaque coupe a été examinée 2 fois en double aveugle. La surface transversale de coupe (STC, mm^2) est calculée comme :

$$\pi / 4 (D_o^2 - D_i^2) \quad (D_i, \text{diamètre interne, mm} ; D_o, \text{diamètre externe, mm} ; D_o = D_i + 2h)$$

Le module élastique et la contrainte pariétale (10^6 dyn/cm^2) sont calculés à partir des équations de Moens-Korteweg et de Lamé :

$$\text{module élastique} = (VOP^2 \cdot D_i \cdot \rho) / h \text{ et contrainte pariétale} = (PAMc \cdot D_i) / 2h,$$

avec ρ = densité du sang, $1,05 \text{ g/cm}^3$.

Le rapport module élastique sur contrainte pariétale est utilisé comme indice de la rigidité pariétale aortique intrinsèque [10, 15, 17].

Le taux tissulaire de calcium ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids sec) d'un fragment de 1 cm de l'aorte thoracique descendante a été déterminé par spectrométrie d'absorption atomique (AA10, Varian Ltd, Melbourne, Australia) après minéralisation et digestion acide (acide nitrique 14 M, [19]).

Un échantillon de l'aorte abdominale (2-3 mg) a été hydrolysé (acide chlorhydrique 6M, 24h, 105°C) ; le taux des acides aminés de pontage, spécifiques de l'élastine, la desmosine et l'isodesmosine ($\mu\text{g g}^{-1}$ de poids frais) a été déterminé par électrophorèse capillaire de zone et détection UV [20].

Le coeur a été prélevé et pesé, le ventricule gauche (incluant le septum) séparé et pesé. La masse ventriculaire gauche (MVG, g.kg^{-1} de poids corporel) est définie comme le rapport du poids du ventricule gauche sur le poids corporel.

Statistiques

Les valeurs sont données en moyenne \pm esm. Une ANOVA de régression linéaire standard pour valeurs paramétriques a été utilisée pour l'étude des relations VOP / PAMc et les résultats exprimés en pentes et intersections. Les différences inter-groupes ont été évaluées par une ANOVA associée au test de Bonferroni. L'hypothèse nulle est rejetée pour une valeur de $P < 0,05$.