

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES	6
INDEX DES PHOTOS	7
INDEX DES TABLEAUX	8
PREAMBULE	9
INTRODUCTION	11

PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I – ETAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES MALADIES CARDIAQUES	15
A – Considérations générales concernant l’insuffisance cardiaque chez l’homme..	15
1 – <i>Epidémiologie des maladies cardiaques chez l’homme</i>	15
2 – <i>Traitements utilisés chez l’homme contre l’insuffisance cardiaque</i>	17
B – Cas particulier de la cardiomyopathie dilatée idiopathique chez l’homme.....	19
1 – <i>Epidémiologie de la cardiomyopathie dilatée chez l’homme</i>	19
2 – <i>Caractéristiques cliniques et pathogéniques de la CMDI</i>	19
3 – <i>Traitements utilisés lors de CMDI</i>	20
C – Approfondissement des connaissances sur l’insuffisance cardiaque humaine par les modèles animaux.....	22
1 – <i>Le chien : modèle de pathologie cardiaque</i>	22
2 – <i>Aspects cliniques de la cardiomyopathie dilatée canine</i>	25
3 – <i>Recherche effectuée sur le modèle canin de cardiomyopathie dilatée</i> ...	27
II – CONSIDERATIONS GENERALES CONCERNANT LA CARDIOMYOPLASTIE	27
A – Biologie cellulaire.....	27
1 – <i>Concept des cellules souches</i>	28
2 – <i>Myogenèse squelettique</i>	28
3 – <i>Spécifications du muscle cardiaque</i>	29
B – De la cardiomyoplastie dynamique à la cardiomyoplastie cellulaire.....	30
1 – <i>Qu’est ce que la cardiomyoplastie dynamique ?</i>	30
2 – <i>Place de la cardiomyoplastie dynamique</i>	30
3 – <i>Mise en application de la méthode pour des affections d’origines diverses</i>	31
C – Cardiomyoplastie cellulaire.....	32

1 – Exemple pour différents organes.....	32
2 – Implantation de cellules pour augmenter le nombre de cardiomyocytes	33
3 – Est-ce « physiologique » que de vouloir régénérer le tissu cardiaque après un infarctus ?.....	33
III – AVANCEES DES RECHERCHES EFFECTUEES SUR LA CARDIOMYOPLASTIE CELLULAIRE	34
A – Types cellulaires utilisés	34
1 – Types de cellules implantables.....	34
2 – Cardiomyocytes et cellules souches fœtaux et néonataux.....	35
3 – Myoblastes.....	37
B – Techniques chirurgicales utilisées.....	38
1 – Cultures cellulaires.....	38
2 - Origine des lésions myocardiques.....	39
3 – Techniques permettant l’implantation des cellules greffées dans myocarde	40
C – Discussion des résultats.....	41
1 – Détails concernant la technique de cardiomyoplastie cellulaire.....	42
2 – Avenir de la cardiomyoplastie cellulaire.....	42
a - La voie des cardiomyocytes.....	42
b - La voie des cellules satellites.....	42
c - La voie des cellules souches.....	43
3 – Autres techniques utilisées récemment.....	43
CONCLUSION TRANSITION.....	44
BUT DE L’ETUDE.....	45
PROTOCOLE.....	47

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE CULTURE DE MYOBLASTES DE CHIEN.....	51
I – MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	51
A - Prélèvement musculaire.....	51
B - Analyses histologiques.....	52
1 - Microscopie optique.....	52

2 - <i>Microscopie électronique</i>	52
C - Préparation du prélèvement pour l'extraction des myoblastes.....	52
D - Techniques de culture de myoblastes.....	53
1 - <i>Technique sur explant</i>	54
a / Préparation des explants.....	54
b / Passages.....	54
2 - <i>Technique mono-enzymatique</i>	55
a - Préparation de la collagénase.....	55
b - Digestion enzymatique des fragments musculaires.....	56
c - Passages.....	56
3 - <i>Technique multi-enzymatique</i>	57
a - Préparation des enzymes.....	57
b - Digestion enzymatique des fragments musculaires.....	57
c - Passages.....	58
E - Contrôles bactériologiques et mycologiques des cultures.....	58
F - Evaluation des 3 méthodes.....	58
1 - <i>Courbes de croissance</i>	58
2 - <i>Richesse en myoblastes des cultures</i>	58
a - Observation de myotubes.....	58
b - Méthode immunocytochimique.....	59
G - Congélation et décongélation des myoblastes.....	59
H - Transport des myoblastes.....	60
II – RESULTATS	61
A - Analyse histologique des muscles prélevés.....	61
B - Evaluation des 3 méthodes.....	61
1 - <i>Courbes de croissance</i>	61
2 - <i>Richesse en myoblastes des cultures</i>	62
a - Observation de myotubes.....	62
b - Méthode immunocytochimique.....	63
C - Congélation et décongélation des myoblastes.....	65
D - Transport des myoblastes.....	65

TRANSPLANTATION CELLULAIRE INTRAMYOCARDIQUE CHEZ DES CHIENS ATTEINTS DE CARDIOMYOPATHIE DILATEE	69
I - MATERIEL ET METHODES	69
A - Recrutement et critères d'inclusion.....	69
B – Anesthésie.....	69
1 – <i>Prémédication</i>	69
2 – <i>Induction</i>	70
3 – <i>Entretien</i>	70
C - Technique chirurgicale.....	71
1 - <i>Voie d'abord</i>	71
2 - <i>Préparation des cellules pour l'implantation intramyocardique</i>	71
3 - <i>Préparation de la seringue de Hamilton</i>	72
4 - <i>Injections intramyocardiques</i>	72
5 - <i>Fermeture du thorax</i>	74
D - Soins post-opératoires.....	74
E - Evaluation clinique des animaux en pré- et post-greffe.....	75
F - Evaluation hémodynamique et de la viabilité myocardique.....	76
1 - <i>Echographie Doppler classique</i>	76
2 - <i>Echographie doppler tissulaire (Doppler Tissue Imaging – DTI)</i>	77
3 - <i>Scintigraphie cardiaque au Thallium</i>	77
G - Prélèvements sanguins.....	78
H - Autopsie et analyse histologique.....	78
II – RESULTATS	79
A - Etat pré-opératoire des chiens.....	79
B - Evaluation clinique des animaux en pré- et post-transplantation.....	82
C - Evaluation hémodynamique et de la viabilité myocardique pré- et post-greffe	83
1 - <i>Echographie Doppler classique</i>	83
2 - <i>Echographie Doppler tissulaire</i>	85
3 - <i>Scintigraphie myocardique au Thallium</i>	86
D - Prélèvements sanguins.....	88
E – Complications post-opératoires.....	89
F – Analyses histologiques des cœurs greffés.....	90

DISCUSSION	91
I – MODELE	91
II – TECHNIQUE DE CULTURE DE MYOBLASTES	91
III – TECHNIQUE CHIRURGICALE	93
IV – RESULTATS SUR L’INSUFFISANCE CARDIAQUE	93
A – Etat clinique des animaux.....	93
B – Echographie doppler couleur.....	94
C – Echographie doppler tissulaire.....	94
D – Scintigraphie cardiaque.....	94
V – Résultats histologiques	95
VI – COMPLICATIONS	96
PERSPECTIVES	99
CONCLUSION	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	109

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence de l'insuffisance cardiaque dans l'étude de Framingham.....	15
Figure 2 : Incidence annuelle de l'insuffisance cardiaque dans l'étude de Framingham....	16
Figure 3 : Résumé du protocole de cardiomyoplastie cellulaire.....	47
Figure 4 : Courbe de croissance cellulaire en fonction des différentes techniques utilisées	62
Figure 5 : Pourcentage de myoblastes dans les cultures.....	64
Figure 6 : Mortalité cellulaire selon différents modes de congélation.....	65
Figure 7 : Nombre de cellules obtenues par boîte de Pétri après 5 jours de culture, en fonction de la température du milieu de transport.....	66
Figure 8 : Mortalité cellulaire en fonction du milieu de transport 2 heures après préparation	66
Figure 9 : Mortalité cellulaire pendant le transport fonction du temps de latence avant la greffe	67
Figure 10 : Zones d'implantation dans les ventricules droit et gauche.....	74
Figure. 11 : Echographie pré et post opératoire en mode Temps-Mouvement : évolution de la fraction de raccourcissement chez le chien n°2, 15 jours, 30 jours et 60 jours après implantation cellulaire83	
Figure 12 : Volume systolique indexé à la surface corporelle (exprimé en ml/m ²), sur les chiens n°2 et 4 avant et après l'implantation de cellules.....	84
Figure 13 : Fraction d'éjection (FE) et fraction de raccourcissement (FR) sur les chiens n°2 et 4 et après l'implantation de cellules.....	84
Figure 14 : Epaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche en systole (PPVGs) et pourcentage de contraction de cette paroi (PP %) sur les chiens n°2 et 4 avant et après.....	85
Figure 15 : Excursion aortique antérieure (EAAO) et espace ES sur les chiens n° 2 et 4 avant et après l'implantation de cellules.....	85
Figure 16 : Scintigraphie myocardique au thallium chez le chien n°2 (coupe sagittale), 4 jours avant et 21 jours après la greffe.....	87
Figure 17 : Scintigraphie myocardique au thallium chez le chien n°2 (coupe frontale), 4 jours avant et 21 jours après la greffe.....	87
Figure 18 : Scintigraphie myocardique au thallium chez le chien n°2, 4 jours avant et 21 jours après la greffe.....	88
Figure 19 : Evolution de la troponine sérique chez le chien n°4, 24 h avant, 48 h et 21 j après la greffe.....	88
Figure 20 : Evolution des CPK chez les chiens n°2, 3 et 424h avant et 48 h après la greffe	89
Figure 21 : Feuille d'explication du protocole pour les propriétaires.....	110

INDEX DES PHOTOS

Photo 1 : Prélèvement du chef cranial du muscle sartorius.....	51
Photo 2 : Cellules satellites obtenues à J+4 par méthode sur explant (x200).....	55
Photo 3 : Cellules satellites obtenues à J+7 par méthode sur explant (x200).....	55
Photo 4 : Cellules satellites obtenues à J+4 par méthode monoenzymatique.....	56
Photo 5 : Cellules satellites obtenues à J+7 par méthode monoenzymatique.....	57
Photo 6 : L'analyse histologique du muscle sartorius par microscopie optique n'a montré aucune anomalie sur les quatre chiens opérés.....	61
Photo 7 : L'analyse histologique du muscle sartorius par microscopie électronique n'a montré aucune anomalie sur les quatre chiens opérés.....	61
Photo 8 : Myotubes obtenus dans les cultures contenant un milieu avec 10% de sérum de cheval	63
Photo 9 : Myotube obtenu dans les cultures contenant un milieu avec 10% de sérum de cheval	63
Photo 10 : Cellules satellites obtenues à J+14 et deux passages.....	64
Photo 11 : Méthode immunocytochimique révélant la desmine, pratiquée sur les cellules de la photo 10.....	65
Photo 12 : Deux cryotubes contenant $2,5 \cdot 10^7$ cellules/mL.....	71
Photo 13 : Seringue de Hamilton.....	72
Photo 14 : Injection réalisée sur le ventricule droit, à droite de l'artère et de la veine interventriculaires antérieures.....	73
Photo 15 : Injection intramyocardique contenant $2,5 \cdot 10^6$ cellules. L'injection est réalisée sur le ventricule gauche entre deux point de suture épocardique.....	73
Photo 16 : chiens n°1 (berger allemand mâle de 13 ans), n°2 (bobtail mâle de 10 ans) et n°4 (danois mâle de 8 ans).....	81

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Causes de l'insuffisance cardiaque dans 31 études.....	16
Tableau II : Causes d'insuffisance cardiaque aiguë.....	18
Tableaux III : Maladies cardiaques sur 300 chiens.....	23
Tableau IV : Paramètres de suivi par échocardiographie avant et après la greffe.....	76
Tableau V : Série des chiens inclus dans le protocole.....	79
Tableau VI : Echographie pré-opératoire chez les 4 chiens de la série.....	80
Tableau VII : Evolution clinique des chiens après la greffe.....	82
Tableau VIII : Comparaison des vitesses myocardiques et des gradients de vitesse endo-épicardiques chez les chiens n°2 et 4, et sur un chien atteint de CMD non greffé et une série de chiens sains	86
Tableau IX : Liste des paramètres étudiés lors de la première consultation, en échocardiographie bidimensionnelle, temps-mouvement et Doppler	111

PREAMBULE

Cette thèse a été le fruit de la collaboration de deux institutions : le Laboratoire d'Etude des Greffes et Prothèses Cardiaques de l'Hôpital Broussais (Pr. Carpentier) et l'Ecole Vétérinaire d'Alfort (ENVA, Prs. Pouchelon et Fayolle).

Les patients atteints de cardiomyopathie dilatée ont été recrutés parmi les animaux consultant dans le service de médecine de l'ENVA (Unité de Cardiologie) ; ces mêmes cas ont été opérés dans le service de chirurgie de l'ENVA (phase de prélèvement de cellules musculaires striées et implantation myocardique par thoracotomie). Les cultures cellulaires ont été réalisées dans le Laboratoire d'Etude des Greffes et Prothèses Cardiaques de l'Hôpital Broussais.

Laboratoire d'Etudes des Greffes
et Prothèses Cardiaques
Hôpital Broussais



INTRODUCTION

En dépit d'une baisse notable de la mortalité due à des atteintes cardiovasculaires, la prévalence de l'insuffisance cardiaque ne cesse d'augmenter dans les pays développés. Malgré les progrès effectués sur le plan du traitement médical, le pronostic de l'insuffisance cardiaque reste grave. Quant à la transplantation cardiaque, son extension est limitée par le manque de donneurs et une survie à long terme qui reste faible (60% à 5 ans). Pour ces raisons, la recherche s'est orientée vers la mise au point d'alternatives thérapeutiques.

Le concept de cardiomyoplastie cellulaire a émergé il y a une dizaine d'années. C'est une technique qui repose sur un apport de cellules exogènes myogéniques dans le myocarde pour suppléer aux cardiomyocytes disparus ou altérés. Le but ultime recherché est la réparation, le remplacement ou la stimulation d'une fonction biologique des cellules altérées, la restitution d'une masse myocardique fonctionnelle et une amélioration des performances contractiles du cœur.

A partir de 1997, des publications font état de résultats extrêmement encourageants en matière de répercussion fonctionnelle, suite à la transplantation de myoblastes dans le myocarde. Les études pratiquées sur l'animal ont toujours eu recours à des lésions myocardiques induites chez différents animaux et par divers procédés, créant ainsi des modèles de pathologie plus ou moins représentatifs de l'affection rencontrée en clinique humaine. Il existe plusieurs races canines présentant des cardiomyopathies dilatées idiopathiques, très proches de la cardiomyopathie humaine tant d'un point de vue clinique qu'anatomo-pathologique et histologique. La nature de cette maladie et le gabarit des chiens atteints (>30kgs) font de ce modèle, un modèle pré-clinique de choix.

Ainsi, dans cette thèse, des rappels bibliographiques seront présentés dans une première partie. Puis dans une seconde partie, l'étude sera présentée. Le protocole porte sur l'implantation de myoblastes autologues chez le chien atteint de cardiomyopathie dilatée. Les objectifs étaient les suivants : (1) mise au point d'une technique fiable et reproductible de culture primaire de myoblastes de chiens, (2) mise au point d'une technique de conservation, de préparation et de transport des cellules, (3) évaluation des effets cliniques et hémodynamiques de l'implantation intramyocardique, (4) étude du devenir histologique des zones greffées.

L'étude présentée dans ce travail de thèse a débuté en 1998. Elle a eu lieu dans le cadre d'une collaboration entre un laboratoire de recherche, qui tentait de développer des modèles expérimentaux de pathologie humaine à l'aide d'animaux atteints physiologiquement d'anomalie cardiaque et le service cardiologie de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, dont les patients correspondaient aux critères souhaités. Cette étude s'est achevée en 2000.

PREMIERE PARTIE :
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I – ETAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES MALADIES CARDIAQUES

A – Considérations générales sur l’insuffisance cardiaque chez l’homme

L'épidémiologie de l'insuffisance cardiaque est relativement peu connue en France, malgré son impact économique considérable sur le système de santé. La plupart des données ont été recueillies à l'étranger, dans des pays anglo-saxons (ex : étude de Framingham). Aucune étude de l'importance de l'étude de cohorte de Framingham n'a été menée en France car ce sont des études trop onéreuses et qui requièrent des prélèvements de données pendant plusieurs dizaines d'années.

1 – Epidémiologie des maladies cardiaques chez l’homme

Dans les années 60, Klainer et Gibson ont été les premiers à mener des études d'épidémiologie aux Etats-Unis. L'incidence de l'insuffisance cardiaque était de 4-5‰/an, et la prévalence de 9-10%. Les chiffres augmentaient nettement avec l'âge (d'après la revue de Delahaye *et al* (1998)).

L'étude de Framingham, commencée en 1949, décrit le suivi d'une cohorte de 5209 sujets pendant plus de 40 ans. La prévalence, de 8‰ chez les sujets de 50 à 59 ans, était de 91‰ chez ceux de 80 à 89 ans (Figure 1). L'incidence annuelle moyenne, de 3‰ chez les hommes de 35 à 64 ans, s'élevait à 10‰ chez les hommes de 65 à 94 ans. Les chiffres étaient respectivement de 2‰ et 8‰ chez les femmes (Figure 2). L'incidence annuelle, ajustée sur l'âge, était plus basse chez les femmes que chez les hommes : odds ratio : 0,60 ; intervalle de confiance à 95% : 0,50 – 0,70. Pendant les années 80, l'incidence annuelle ajustée sur l'âge était de 2,3‰ chez les hommes et de 1,4‰ chez les femmes, les nombres étant respectivement de 7,2‰ et 4,7‰ chez les hommes et les femmes de plus de 45 ans (d'après la revue de Delahaye *et al* (1998)).

Figure 1 : Prévalence de l'insuffisance cardiaque dans l'étude de Framingham (d'après Delahaye *et al*, 1998)

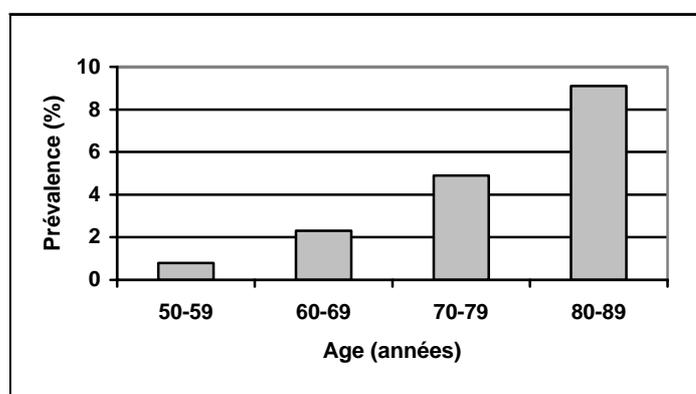
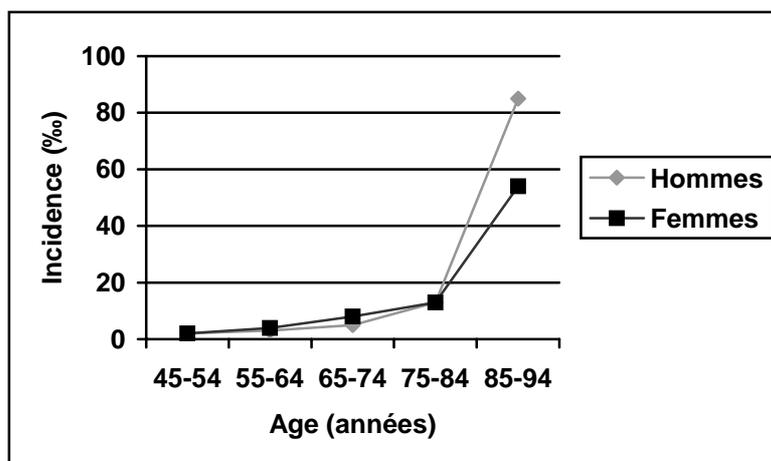


Figure 2 : Incidence annuelle de l'insuffisance cardiaque dans l'étude de Framingham (d'après Delahaye et al, 1998)



Chez l'homme, toutes les maladies cardiaques peuvent conduire à l'insuffisance cardiaque. Dans plus de la moitié des cas, l'insuffisance cardiaque est secondaire à une ischémie (infarctus du myocarde). Les maladies valvulaires ne sont plus qu'une cause rare d'insuffisance cardiaque, contrairement aux carnivores domestiques chez qui l'insuffisance cardiaque est due, en priorité, aux maladies valvulaires. L'hypertension artérielle était un facteur de risque d'insuffisance cardiaque majeur il y a 40 ans, mais aujourd'hui elle n'est souvent qu'une cause associée (tableau I) (d'après la revue de Delahaye *et al* (1998)).

Tableau I : Causes de l'insuffisance cardiaque sur une moyenne de 31 études (d'après Delahaye et al, 1998)

Cause	Pourcentage
Ischémique	50,3
Non ischémique	36,4
- idiopathique	18,3
- valvulaire	4,0
- hypertensive	3,8
- alcoolique	1,8
- virale	0,5
- post-partum	0,4
- autre	7,6
Non retrouvée	13,3

D'autre part, alors que nous pensons que la mortalité de l'insuffisance cardiaque a diminué, et que son incidence a augmenté, la seule étude effectuée sur une cohorte sur une très longue durée montre un taux de mortalité stable et une diminution de l'incidence ajustée sur l'âge. Ces informations étant en contradiction avec la plupart des essais thérapeutiques actuels, on peut se demander quelle en est l'origine. L'explication la plus probable pour expliquer ces différences est que durant l'étude à Framingham, très peu de patients ont bénéficié des thérapeutiques dont on a

montré qu'elles amélioreraient le pronostic ou ont eu une transplantation cardiaque (d'après la revue de Delahaye *et al* (1998)).

2 – Traitements utilisés chez l'homme contre l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque débute toujours par une phase aiguë. Elle peut apparaître dans différents cas de figures : soit elle se présente chez un patient ayant une pathologie cardiaque connue, soit elle révèle une cardiopathie jusque là méconnue, soit enfin elle vient compliquer une atteinte ischémique myocardique ou infectieuse. Il faut alors agir à 2 niveaux : d'abord effectuer un traitement symptomatique, principalement basé sur les inotropes, puis déterminer la cause de cette crise qui orientera le traitement à long terme du patient.

Les premières manifestations de l'insuffisance cardiaque aiguë sont des degrés variables de congestion et des signes d'hypoperfusion périphérique. L'œdème pulmonaire est la manifestation de l'insuffisance cardiaque congestive par dysfonction ventriculaire gauche. La turgescence jugulaire est le signe majeur à rechercher en urgence en faveur d'une insuffisance cardiaque droite. A cela, s'ajoutent une hypotension artérielle, une tachycardie, des marbrures des extrémités, des troubles de la conscience et une oligurie. Un bilan biologique, ECG, radiographie pulmonaire, ainsi qu'un bilan échocardiographique doivent être effectués.

Ensuite, deux cas de figures sont possibles : si la pression artérielle est conservée, le traitement associe des diurétiques d'action rapide administrés par voie veineuse (réduction de la précharge par un effet initial de veinodilatation puis d'une diurèse riche en sodium) et des dérivés nitrés, vasodilatateurs artériels et veineux (diminution de remplissage ventriculaire). Si la pression artérielle est basse, le traitement reposera sur des agents thérapeutiques inotropes positifs : la dobutamine agit par l'intermédiaire de la stimulation bêta adrénergique, la dopamine a des effets alpha et bêta stimulants suivant la posologie (alpha, vasoconstricteur, pour des posologies élevées), les inhibiteurs de la phosphodiesterase augmentent le calcium intracellulaire et enfin la noradrénaline et l'adrénaline sont des catécholamines ayant un puissant effet vasoconstricteur. A ces molécules, s'ajoute une bonne oxygénation du patient (d'après Bosio *et al* (1998)).

Une fois toutes les données recueillies et l'état du patient stabilisé, il est, le plus souvent, possible de déterminer les mécanismes et la nature de la cardiopathie qui sont responsables de l'insuffisance cardiaque. Il faut attacher une grande importance à la recherche des facteurs déclenchants (Tableau II). Deux cas de figure sont possibles : soit le problème cardiaque est chronique, une médicalisation étant déjà en place et l'origine de la crise d'insuffisance cardiaque est souvent une mauvaise observance du traitement. Ou alors, une poussée ischémique au niveau du myocarde ou l'apparition d'un trouble du rythme (le plus souvent supra ventriculaire) entraîne l'apparition d'une anomalie cardiaque ou vient compliquer l'état d'équilibre d'une maladie chronique.

Tableau II : Causes d'insuffisance cardiaque aiguë (d'après Bosio et al, 1998)

Anomalies mécaniques

Surcharge barométrique

- rétrécissement aortique
- hypertension artérielle

Surcharge volumétrique

- insuffisance aortique ou mitrale
- hyper volémie (transfusions, rétention hydro sodée)
- shunts

Obstacle au remplissage ventriculaire

- rétrécissement mitral
- prothèse volémie

Adiastolie

- péricardite constrictive
- tamponnade

Anéb9(u2nee920[(Anéhtenrn)7.7ie)-0.8(ul20[(A(a)-1.4ir(e)]TJ0]-1.1467 TD0Tc0Tw()Tj/TT4 1 Tf0]-1.7533 TD=0.0014 Tc0:0

(1998) décrivent une étude hémodynamique à 1 an concernant 171 malades montrant clairement l'amélioration fonctionnelle et celle de la fraction d'éjection. Enfin, même si l'incidence de l'insuffisance mitrale est faible dans les cardiopathies ischémiques chroniques, un geste chirurgical simple suffit le plus souvent à corriger l'insuffisance mitrale et permet de diminuer la post-charge du ventricule défaillant.

Ainsi, quelles que soient les méthodes alternatives, il est clairement démontré qu'elles apportent un bénéfice fonctionnel certain : cependant, elles n'augmentent pas toujours le débit cardiaque, ne font pas l'objet d'étude prospective randomisée et surtout nécessitent une sélection précise et minutieuse des malades, qui n'est pas encore standardisée pour toutes les indications. L'avantage de ces interventions est certain puisqu'il n'y a pas de délai d'attente, que le résultat fonctionnel, en cas de bonne indication, est démontré et qu'en cas de nécessité, une transplantation cardiaque secondaire est toujours réalisable.

B – Cas particulier de la cardiomyopathie dilatée chez l'homme

Comme nous venons de le voir, l'insuffisance cardiaque pose un véritable problème de santé publique et sa gestion est loin d'être maîtrisée. Nous allons nous intéresser à une maladie cardiaque particulière de l'homme : la cardiomyopathie dilatée idiopathique.

1 – Epidémiologie de la cardiomyopathie dilatée chez l'homme

La cardiomyopathie dilatée idiopathique (CMDI) est une maladie myocardique primaire dont la cause est inconnue. Cette maladie est caractérisée par une dilatation du ventricule gauche ou des deux ventricules et par une contractilité myocardique insuffisante. Selon le critère qui a orienté le diagnostic, l'incidence annuelle rapportée varie entre 5 et 8 cas pour 100 000 personnes. Cependant, la véritable incidence est probablement sous estimée du fait de la méconnaissance de tous les cas, parfois asymptomatiques. La prévalence ajustée sur l'âge aux Etats-Unis est de 36 cas pour 100 000 personnes et cette maladie entraîne la mort de 10 000 personnes par an. Les afro-américains et les personnes de sexe mâle ont 2,5 fois plus de risque d'être atteint que les caucasiens et les personnes de sexe féminin. De plus, une association certaine a été rapportée entre la CMDI et l'hypertension, l'utilisation d'agonistes bêta-adrénergique et la consommation d'alcool (Dec et Fuster (1994)).

Depuis que l'on a mis en évidence que la dilatation ventriculaire et la dysfonction cardiaque pouvaient être soit acquises soit d'origine héréditaire, la différenciation que l'on fait maintenant entre les deux formes (la forme acquise pouvant être potentiellement réversible) a de fortes implications aussi bien pronostiques que thérapeutiques (Dec et Fuster (1994)).

2 – Caractéristiques cliniques et pathogéniques de la CMDI

La plupart des patients consultent pour la première fois entre 20 et 50 ans, mais la maladie peut aussi être présente chez des enfants ou chez des personnes âgées. La première manifestation

clinique de cette maladie est généralement une crise d'insuffisance cardiaque aiguë sévère (75 à 85% des patients). Les symptômes d'une insuffisance cardiaque gauche sont prédominants, avec une augmentation de l'intolérance à l'effort et l'apparition progressive d'une dyspnée. Les premiers symptômes incluent donc une dyspnée lors d'exercice (86% des patients), des palpitations (30%) et des oedèmes périphériques (29%). Des cardiomégalies asymptomatiques sont diagnostiquées chez 4 à 13 % des patients. Durant l'évolution de leur maladie, 95% des patients ont présentés des symptômes d'insuffisance cardiaque. La distension abdominale, la douleur thoracique, les nausées et l'anorexie attribuées à une insuffisance cardiaque droite peuvent être présents lors d'une apparition brutale de la maladie (Dec et Fuster (1994)).

Les recherches sur la pathogénie de la CMDI ont permis de révéler quatre mécanismes fondamentaux qui ne sont pas forcément exclusifs et peuvent se combiner en cas de manifestation clinique de la maladie :

- Les facteurs génétiques et familiaux. La maladie génétique semble être très fréquente : 20% des patients au moins possèdent dans leur ascendance des historiques familiaux de cardiomégalie ou de fraction de raccourcissement basse. Des atteintes de divers gènes ont été mises en évidence. Ainsi, on sait maintenant qu'il existe une prédisposition génétique à la CMDI (pour plus de détails, se reporter à la revue de Dec et Fuster (1994)).

- La myocardite virale et action d'autres cytotoxiques. Ainsi, la CMDI semble pouvoir être une séquelle de myocardite virale chez certains patients, mais distinguer les deux formes sur une présentation clinique aiguë est impossible. Beaucoup de résultats récents se contredisent et les interactions exactes entre les deux maladies restent encore à définir (Dec et Fuster (1994)).

- Les anomalies immunes. Les anomalies immunes ont toujours été constatées lors de CMDI : le problème est de savoir si elles sont primaires ou secondaires. Ainsi, le développement de myocardite virale est systématiquement associé à une baisse d'activité des lymphocytes T killer. De plus, on a pu constater la présence d'auto anticorps dirigés contre le muscle cardiaque (Dec et Fuster (1994)).

- Le rôle du système nerveux sympathique. On sait que les anomalies métaboliques, énergétiques et contractiles entraînent une progression de la maladie. Ainsi, on a pu constater que chez le patient atteint de CMDI, on a une baisse de la densité en récepteurs bêta-adrénergique, plus importante que chez les patients atteints de maladie ischémique. Cela expliquerait la mauvaise réponse aux traitements médicaux mis en place chez les patients atteints de CMDI (Dec et Fuster (1994)).

3 – Traitements utilisés lors de CMDI

Les mesures hygiéniques thérapeutiques allient du repos, une perte de poids, un arrêt de la cigarette s'il y a lieu, une consommation modérée de l'alcool et une réduction de l'activité physique durant les périodes de décompensation. Les agents diurétiques ont un rôle important dans le contrôle

de l'insuffisance cardiaque mais doivent être évités en cas de cardiomégalie asymptomatique (Dec et Fuster (1994)).

Le traitement à base de vasodilatateurs peut être considéré comme le traitement initial standard pour tout patient atteint de CMDI développant des symptômes de dysfonction du ventricule gauche (Dec et Fuster (1994)).

D'autre part, chez les patients atteints de CMDI, il existe un risque d'embolie pulmonaire ou systémique, du fait de la stase sanguine et de l'hypocontractilité du ventricule qui entraîne l'activation du processus de coagulation. De ce fait, pour éviter les complications de thromboembolie mais aussi minimiser les risques d'hémorragies, un traitement à base d'anticoagulant peut être utilisé mais il doit être ajusté pour que le temps de Quick ne dépasse pas 2 à 3 fois la norme supérieure (Dec et Fuster (1994)).

En ce qui concerne les troubles du rythme, on a pu constater que la tachycardie ventriculaire asymptomatique était fréquente chez les patients atteints de CMDI mais que sa suppression par une médication ne prolongeait pas la survie. De plus, l'adjonction de produits anti-arythmiques paraît entraîner des complications qui peuvent s'avérer fatales (Dec et Fuster (1994)).

Pendant longtemps, l'utilisation des digitaliques a donné lieu à de nombreuses controverses. Récemment, des essais ont montré que les digitaliques étaient efficaces pour contrôler les symptômes d'insuffisance cardiaque chez les patients ayant un rythme sinusal normal. Des effets bénéfiques à long terme ont été prouvés sur la fraction de raccourcissement, sur la capacité à l'effort et sur les symptômes d'insuffisance cardiaque (Dec et Fuster (1994)).

A l'inverse des digitaliques, la majorité des agents inotropes oraux n'ont pas beaucoup d'intérêt dans le traitement des patients atteints de CMDI. En effet, des études récentes montrent que, malgré des bénéfices hémodynamiques à court terme, l'administration d'inotropes ne permet pas d'augmenter la capacité à l'effort (Dec et Fuster (1994)).

Enfin, comme nous l'avons vu plus haut, la dernière alternative pour les patients atteints de CMDI est chirurgicale. La CMDI reste la principale indication pour la transplantation cardiaque chez les adultes et les enfants. Les inconvénients de cette méthode sont toujours les mêmes : manque de donneurs, donneurs non prévisibles, complications à long terme liées à l'immunosuppression... D'autres alternatives chirurgicales restent possibles pour des patients soigneusement sélectionnés. Ainsi, deux nouvelles options thérapeutiques sont à l'étude, l'une sous l'influence de Steven Bolling qui a proposé une simple annuloplastie mitrale et qui retrouve à la fois une amélioration fonctionnelle mais aussi une amélioration hémodynamique en terme d'augmentation de débit cardiaque et d'amélioration de la consommation d'oxygène à l'effort, avec un taux de survie (méthode actuarielle) qui dépasse largement celui de la transplantation cardiaque à un an et à deux ans. La seconde intervention en date appelée Batista, est en fait une intervention de réduction ventriculaire couplée à une correction de l'insuffisance mitrale. Dreyfus (1998) rapporte une évaluation de 20 malades effectuées à l'hôpital Foch pour cette intervention dont seulement 5 ont été retenus pour l'intervention. Si tous les malades se sont améliorés au plan fonctionnel, certains ont vu

leur hémodynamique inchangée, d'autres ont amélioré leur hémodynamique au repos, et parfois à l'effort. La « série » de Cleveland Clinic, de McCarthy *et al* (1997), montre des résultats sur 57 malades.

C – Approfondissement des connaissances sur l'insuffisance cardiaque humaine par les modèles animaux

L'évolution de l'insuffisance cardiaque entraîne une augmentation dramatique de la mortalité ainsi que de la morbidité. Associé à cela, le coût très élevé des thérapies mises en place et les admissions récurrentes à l'hôpital ont motivé, durant ces 20 dernières années, le financement de recherches intensives dans ce domaine. Un des principaux objectifs de ces recherches est de permettre une amélioration de la qualité de vie des patients. Malgré cela, les thérapies disponibles pour l'insuffisance cardiaque incluent des traitements médicaux dont l'efficacité, bien que prouvée, reste limitée et des traitements chirurgicaux applicables uniquement pour des cas soigneusement sélectionnés (Li *et al* (1998)). Ainsi, les recherches qui continuent à avancer, nécessitent maintenant des modèles animaux qui diffèrent de ceux utilisés habituellement.

1 – Le chien : modèle de pathologie cardiaque

Depuis longtemps, on sait qu'une fois les techniques décrites sur des animaux de laboratoire (rat, souris, lapin...), il faut les tester sur des animaux de plus grand gabarit avant de pouvoir les utiliser chez les hommes. A ce titre, le modèle canin est très intéressant car, en France, le chien est de plus en plus médicalisé. On a donc une connaissance accrue de toutes les maladies cardiaques dont il peut souffrir physiologiquement.

Ainsi, d'après quelques études récentes faites sur des cohortes dans des pays anglo-saxons rapportées par Buchanan (1999), il semble qu'environ 10% des chiens présentés en consultation viennent pour des maladies cardiovasculaires. Les maladies les plus souvent rencontrées durant les consultations de cardiologie sont les maladies atteignant les valvules atrio-ventriculaires, les maladies congénitales, les cardiomyopathies et les épanchements péricardiques suite à des néoplasies (Tableau III).

Comme nous l'avons vu dans le tableau I, plus de la moitié des insuffisances cardiaques chez l'homme ont une origine ischémique. Chez le chien, les pathologies coronaires consécutives à de l'athérosclérose sont rarissimes car le chien n'a pas le même métabolisme lipidique que les hommes. En effet, on sait que chez l'homme, ce sont les lipoprotéines de faible densité (LDL), transporteuses du cholestérol dans le sang qui sont athéromateuses, c'est-à-dire qui accélèrent l'apparition d'athérome, les « plaques » lipidiques qui se déposent dans les vaisseaux (notamment les artères coronaires) et finissent par les obstruer. Or, chez le chien, les LDL sont très peu présentes. Ce sont les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui jouent les rôles primordiaux.

Tableau III : Maladies cardiaques sur 300 chiens (d'après Buchanan (1999))

Diagnostic	Nombre	Pourcentage
Maladie valvulaire chronique (33 souffrant d'arythmies)	120	40.0
Arythmie primaire (fraction de raccourcissement > 25%)	50	16.7

sur les radios même s'il existe toujours une augmentation de taille de l'atrium gauche chez les chiens symptomatiques. Cependant, l'échocardiographie peut révéler une baisse sévère de la fonction systolique. L'apparition des signes cliniques de l'insuffisance cardiaque gauche est souvent aiguë, généralement caractérisée par l'apparition d'une toux sèche (compression de la bronche souche gauche par l'atrium) (McEwan (2000a)).

- Formes des Braques de Weimar : ils présentent une forme sévère à évolution rapide. Les arythmies ventriculaires sont fréquentes et peuvent entraîner une mort subite, avant le développement d'autre signe clinique (McEwan (2000a)).

- Formes des Boxers : la forme du Boxer est atypique. Les Boxers atteints montrent des modifications histopathologiques qui affectent le myocarde avec un remplacement des cardiomyocytes par un infiltrat fibro-adipeux, situé principalement ou initialement dans le ventricule droit. Beaucoup de Boxers ont des arythmies ventriculaires qui précèdent l'apparition des signes échographiques de la maladie. Dans les stades précoces, ces arythmies peuvent être à l'origine de syncopes, en sachant que les morts subites sont moins fréquentes que chez les Dobermans. Les ectopies ventriculaires ont une forme caractéristique. La fibrillation atriale peut apparaître avec une augmentation de taille des atria (McEwan (2000a)).

- Formes des Spaniels : depuis 1980, les cockers anglais sont reconnus comme génétiquement prédisposés à la CMD. Les chiens affectés semblent avoir une forme relativement bénigne mais non moins évolutive de CMD. Beaucoup de chiens peuvent survivre à plusieurs crises d'insuffisance cardiaque aiguë et redevenir stable avec une médication adéquate. La taille du cœur, qui peut être suivie par des radiographies thoraciques, peut diminuer avec un traitement adapté. L'électrocardiogramme montre souvent une onde R très élevée et parfois un bloc de branche gauche. Une des caractéristiques cliniques souvent rapportée est un pouls « alternatif » c'est-à-dire qu'un battement cardiaque sur deux donne un pouls fémoral faible ou imperceptible. Chez l'homme, c'est un signe d'insuffisance myocardique sévère alors que cela ne semble pas être de mauvais pronostic chez les Spaniels. On sait que chez le cocker américain, la CMD peut être due à une déficience en taurine et peut donc répondre à un traitement basé sur une supplémentation en taurine et en L-carnitine. Pourtant, une fois la CMD apparue, et malgré le traitement, on n'aura jamais une régression totale des signes, à l'inverse du chat, qui peut aussi présenter des déficiences en taurine, mais chez qui les lésions myocardique disparaîtront totalement avec une supplémentation. Les springers anglais peuvent aussi développer une CMD : cette forme est généralement d'évolution plus rapide et le pronostic est plus mauvais que chez les cockers (McEwan (2000a)).

- Formes des chiens d'eau portugais : une forme atypique de CMD touche les chiots âgés de 2 à 32 semaines de cette race. Un mode de transmission génétique autosomal récessif a été démontré. La maladie n'a, pour l'instant, été décrite qu'aux USA. Cependant, les éleveurs de Grande Bretagne suspectent que la maladie soit quand même présente dans leurs portées. Le problème est que les symptômes étant très frustrés, la maladie est difficile à objectiver : les chiots présentent une dyspnée d'apparition brutale, très vite suivie par la mort de l'animal (McEwan (2000a)).

2 – Aspects cliniques et traitements de la cardiomyopathie dilatée canine

Plusieurs races canines présentent des cardiomyopathies dilatées idiopathiques très proches de la cardiomyopathie humaine. Les animaux atteints sont généralement des grands chiens : Doberman, Boxer, Irish Wolfhound, Dogue Allemand, Terre Neuve, Saint Bernard, mais aussi Cocker Spaniel et Schnauzer (Tidholm et Jonsson (1997) et Tidholm *et al* (2001) et Tidholm *et al* (1997)). Les chiens mâles sont plus fréquemment atteints que les femelles (Tidholm A et Jonsson L, (1997)). Il n'y a pas de prédisposition selon l'âge ; l'âge n'est représentatif que d'un point de vue pronostic. Ainsi, plus l'animal développe les signes cliniques précocement, plus le pronostic vital sera mauvais. Les symptômes les plus couramment rencontrés sont la toux, l'abattement, l'inappétence, la dyspnée, la perte de poids, la polypnée, la distension abdominale, des syncopes et de la polydipsie (Tidholm A et Jonsson L (1997)). Le diagnostic repose sur des critères cliniques et épidémiologiques ainsi qu'échographiques et électrocardiographiques : une augmentation des diamètres systoliques et diastoliques des cavités ventriculaires et une diminution du pourcentage d'épaississement de la paroi postérieure du ventricule gauche (inférieur ou égal à 20 %) et une fraction de raccourcissement inférieure à 25 %. Une fibrillation auriculaire ainsi que des extrasystoles ventriculaires sont fréquemment retrouvées.

Le traitement de la CMD est axé sur la lutte des conséquences de l'insuffisance cardiaque congestive plutôt que sur le traitement de la cause primaire, à savoir l'hypocontractilité du myocarde. Ainsi, le but du traitement est d'améliorer ou au moins de maintenir un niveau de vie acceptable pour l'animal et de tenter d'atténuer ses symptômes. Mais ce traitement n'empêchera pas la lente détérioration de la fonction myocardique : beaucoup de patients meurent ou sont euthanasiés suite à leur CMD. Ce traitement doit permettre de contrôler les oedèmes pulmonaires et les épanchements, d'éviter l'activation neuroendocrine liée à l'insuffisance cardiaque congestive, augmenter l'éjection cardiaque et contrôler les arythmies (McEwan (2000b)).

- Le contrôle des oedèmes et des épanchements se fait surtout par l'utilisation de diurétiques. Ces diurétiques ne doivent jamais être utilisés seuls car ils activent le système rénine-angiotensine. On doit donc ajouter en parallèle un Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (IECA). En cas d'oedème aigu du poumon (OAP), le furosémide, diurétique de l'Anse, doit être injecté préférentiellement en intraveineux car il a un effet veinodilatateur supplémentaire quand il est administré par cette voie. Toutefois, il faut éviter des injections intraveineuses à répétitions car l'éjection cardiaque peut chuter rapidement par suite à une hypovolémie. En cas de crise aiguë incoercible, on peut effectuer une application de trinitrine en complément : c'est un veinodilatateur puissant qui se présente sous la forme de pommade à appliquer sur une peau sans poils et très vascularisée (généralement l'oreille). Une fois la crise d'OAP stabilisée, les diurétiques peuvent être administrés à long terme mais en administrant une dose minimale à déterminer selon les individus et en prescrivant des diurétiques à actions différentes (ex : diurétiques de l'Anse + spironolactone) car on a pu constater une adaptation rapide de l'organisme à ces traitements. En cas d'épanchements, une thoracocentèse peut être effectuée en parallèle du traitement médical s'il existe une importante gêne respiratoire (McEwan (2000b)).

- Pour éviter l'activation neuroendocrine liée à l'insuffisance cardiaque, on utilise des IECA. En effet, l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone est responsable de beaucoup de symptômes de l'insuffisance cardiaque congestive. Ces IECA ont de nombreux avantages : ils sont

relativement vasodilatateurs, ils préviennent la rétention hydro-sodée, ils préviennent les effets de l'Angiotensine II au niveau du système nerveux central et enfin ils limitent le remodelage et la fibrose du myocarde (McEwan (2000b)).

- Pour augmenter l'éjection cardiaque, il semble logique d'administrer des agents inotropes positifs, connus pour accroître l'éjection cardiaque, sur des patients atteints de CMD. Pourtant, on se rend compte que cette administration peut s'avérer délétère. En effet, l'augmentation de consommation d'oxygène par le myocarde et l'apparition d'arythmies ont été décrites à la suite d'utilisation d'inotropes positifs. Au lieu de cela, le but du traitement devrait être de réduire le travail du myocarde. Mais, on s'est rendu compte que des produits tels les IECA permettaient cette réduction. Et en fin de compte, ramener la fréquence cardiaque dans des valeurs normales (soit inférieure à 160 battements par minute (bpm)) et contrôler les tachyarythmies est aussi important que d'alléger le travail du myocarde. La digoxine est l'inotrope le plus utilisé en cas de CMD sur les chiens. Bien que ce soit un inotrope positif, sa principale action est de contrôler la réponse ventriculaire en cas de tachyarythmies supraventriculaires, particulièrement en cas de fibrillation atriale. Il agit par un effet vagal indirect en ralentissant la conduction dans le nœud atrioventriculaire. Bien que les agents inotropes positifs entraînent théoriquement une augmentation de la consommation d'oxygène, l'effet vagal de la digoxine inverse ce processus. Le pimobendan est un nouveau médicament qui s'est montré prometteur dans le traitement de la CMD chez le chien en association avec d'autres produits incluant les IECA, des diurétiques et la digoxine si nécessaire. C'est un inotrope positif mais qui possède aussi un effet vasodilatateur : c'est un inodilatateur. De plus, il n'augmente pas la consommation d'oxygène du myocarde (McEwan (2000b)).

- Concernant les arythmies, c'est la fibrillation atriale qui est fréquemment rencontrée chez les chiens atteints de CMD. Elle est la conséquence d'une maladie myocardique atriale ou d'une dilatation de l'atrium. De ce fait, il n'est généralement pas possible de faire disparaître cette arythmie car les lésions atriales sont souvent irréversibles. De plus, ce sont les conséquences de cette arythmie qui sont néfastes (augmentation de la fréquence cardiaque) et donc, sur lesquelles on va orienter le traitement. Généralement, on agit sur le nœud atrioventriculaire pour y ralentir la conduction : la digoxine est l'agent le plus efficace pour cette indication. Si on arrive à contrôler les signes d'insuffisance cardiaque congestive, que le taux de digoxinémie est dans les normes recommandées mais que la fréquence cardiaque continue à être supérieure à 160 bpm, alors on peut utiliser d'autres produits tels le diltiazem, antagoniste des canaux calciques ou les bêta-bloquants. En ce qui concerne les tachyarythmies ventriculaires, il est important de savoir si elles ont des répercussions hémodynamiques et donc, si elles peuvent entraîner une mort subite. Si ce n'est pas le cas, un traitement n'est pas utile. Par contre, si on est en présence de tachyarythmies ventriculaires qui entraînent une atteinte sévère de l'éjection cardiaque telles de fréquentes extrasystoles prématurées polymorphes ou des salves d'extrasystoles monomorphes, alors un traitement antiarythmique doit être mis en place. Ce sont les antiarythmiques de classe IB qui sont le plus couramment utilisés : la lidocaïne est administrée en intraveineux pour le traitement en urgence et la méxilétine est le produit de référence pour la forme orale. Quand un traitement antiarythmique est mis en place, une vérification de son efficacité doit être effectuée par un monitoring par Holter pendant 24h, car chez certains individus, les produits antiarythmiques peuvent avoir des effets inverses, c'est-à-dire proarythmiques (McEwan (2000b)).

Malgré un traitement médical comportant des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), des diurétiques et des digitaliques, le pronostic de ces cardiopathies reste

sombre dans la majorité des cas : 65 à 112 jours de survie moyenne selon Monnet *et al* (1995) et Tidholm *et al* (1997). Le taux de survie à 1 an et à 2 ans est de 17,5 % et 7,5 % respectivement. La dyspnée et l'ascite ainsi que le jeune âge au moment du diagnostic sont des facteurs prédictifs négatifs. (Tidholm *et al* (1997))

3 – Recherche effectuée sur le modèle canin de cardiomyopathie dilatée

De nombreux cœurs de chiens atteints de cardiomyopathie dilatée ont été analysés : les lésions nécropsiques retrouvées incluent fréquemment une dilatation sévère des quatre cavités cardiaques, un amincissement des parois de ces cavités et des lésions pulmonaires et hépatiques consécutives à l'insuffisance cardiaque (Tidholm et Jonsson (1997) et Van Vleet *et al* (1981)).

En microscopie optique, une apparence ondulée des fibres cardiaques décrites par Tidholm *et al* (1998), une fibrose interstitielle sous-endocardique, des foyers de nécrose et une hyperplasie de la média des vaisseaux myocardiques sont observés (Tidholm et Jonsson (1997) et Van Vleet *et al* (1981)).

En effectuant des expérimentations sur le modèle canin de cardiomyopathie dilatée, c'est les connaissances de la forme humaine que l'on accroît. En effet, il y a des expériences qui ne peuvent être réalisées directement sur l'homme. Ainsi, par exemple, des interventions telle que la cardiomyoplastie dynamique, que nous verrons plus en détail plus loin, a été expérimenté chez le chien par Orton *et al* (1994) : cette intervention consiste en un « drapage » du cœur malade par le muscle grand dorsal et de stimuler ce muscle afin d'aider le cœur à fonctionner. Dans un registre un peu similaire, White *et al* (1997) ont effectué une contre pulsion extra aortique par aortomyoplastie sur 7 chiens atteints de cardiomyopathie dilatée.

En conclusion la cardiomyopathie dilatée idiopathique présente l'avantage d'être physiologique chez le chien et d'entraîner une atteinte généralisée du myocarde. Les lésions retrouvées sur ces myocards miment les lésions présentes en cas d'ischémie (altérations voire destruction des myocytes entraînant des relâchements du myocarde, des dilatations et enfin des baisse de la fonction cardiaque) mais à un degré plus général. Ainsi, il est intéressant de tester des techniques chirurgicales sur ces cœurs malades, car si ces techniques fonctionnent pour des cœurs atteints dans leur globalité, on peut supposer qu'elles fonctionneront pour des plages de myocards ischémiés.

II – CONSIDERATIONS GENERALES CONCERNANT LA CARDIOMYOPLASTIE

A – Biologie cellulaire

Pour beaucoup de maladies graves intéressant des organes vitaux, l'unique solution en dernier recours est la transplantation de l'organe dans son intégrité. Depuis quelques années, un nouveau

concept se développe qui tend à vouloir agir au niveau cellulaire ou moléculaire et non plus au niveau de l'organe entier. Le but est donc de « remplacer » les cellules défectueuses.

1 – Concept des cellules souches

L'embryon de mammifère est formé de cellules pluripotentes qui ont la capacité, à terme, de former un organisme dans sa globalité. La capacité à former de multiples lignées cellulaires s'atténue progressivement au fur et à mesure du développement, grâce à un processus que l'on connaît comme la différenciation. Les cellules souches à proprement parler peuvent donner naissance à des cellules de diverses lignées (par exemple, les cellules-mères hématopoïétiques pluripotentes donnent des lignées sanguines variées) alors que les cellules à visée proliférative (tels les myoblastes aussi appelés cellules satellites et les cardiomyocytes embryonnaires) ne formeront qu'une lignée donnée de cellules mais permettront leur multiplication. La différenciation de ce dernier type cellulaire se fait de manière autonome, sans qu'il n'y ait d'influence de l'environnement (d'après revue de Kessler et Byrne (1999)).

Suite à une lésion donnée, les vertébrés vont avoir la capacité d'activer les cellules souches ou les cellules à visée proliférative de l'organe lésé (moelle osseuse) ou d'entraîner la multiplication de cellules différenciées qui ont gardé la capacité de se multiplier (cellules hépatiques ou endothéliales). Dans le muscle squelettique, les cellules à visée proliférative (myoblastes adultes/cellules satellites) situées sous la lame basale, se mettent à se multiplier en cas de lésion. Le développement ou la réparation du muscle squelettique se fait selon un enchaînement donné, avec l'intervention des myoblastes qui vont d'abord se multiplier puis fusionner pour former des myotubes (d'après revue de Kessler et Byrne (1999)).

Dans le cœur des mammifères, la population de cellules d'auto renouvellement (cellules souches ou à visée proliférative) est absente ; cela signifie que la capacité proliférative des cardiomyocytes adultes est limitée. A la suite d'une lésion ou d'un infarctus, il n'y a pas de synthèse d'ADN qui est mis en évidence. Il n'y a donc pas de réparation possible de ce tissu cardiaque (d'après revue de Kessler et Byrne (1999)).

2 – Myogenèse squelettique

En dépit des évidentes similitudes entre le muscle cardiaque et les muscles squelettiques (les deux étant des muscles striés), il y a aussi des différences fondamentales entre les deux types de tissu, incluant la morphologie, les mécanismes d'excitation contraction, l'origine embryologique et la réponse aux lésions. Le muscle strié squelettique adulte est capable de se régénérer à partir de cellules myogéniques aortique qui sont en position satellites des fibres musculaires. Ces cellules sont issues d'une population de myoblastes embryonnaires qui s'accolent, sans fusionner, aux premiers éléments multi nucléés (myotubes) avant la mise en place des lames basales. On retrouve donc les cellules satellites dans le muscle adulte, étroitement accolées à la fibre striée, sous la lame basale. Chaque fibre est également entourée par une gaine conjonctive, l'endomysium. L'isolement en vue d'une culture primaire des cellules myogéniques nécessite donc la dissociation de l'endomysium, puis des lames basales, enfin du ciment intercellulaire qui unit la cellule satellite à la fibre. Cette

dissociation qui nécessite l'action d'enzymes protéolytiques, représente la difficulté majeure pour l'obtention de myoblastes viables, capables de proliférer, puis de fusionner. Ensuite, la différenciation in vitro des structures multi nucléées excitables, que sont les myotubes et les fibres musculaires, est aussi délicate. Le nombre de ces cellules myogéniques évolue de façon considérable au cours du développement fœtal et post-natal (Gautron).

La myogenèse squelettique entraîne l'activation de l'expression d'un gène spécifique du muscle et une reprise du cycle cellulaire : le gène MyoD. Bien que la multiplication et la différenciation soient uniquement présentes chez les myoblastes squelettiques, les cardiomyocytes différenciés peuvent aussi proliférer mais seulement jusqu'à la naissance (D'après la revue de Kessler et Byrne (1999)). Le gène de différenciation musculaire MyoD a été identifié et a conduit à la découverte de toute une famille de détermination myogénique. L'expression forcée de membres de cette famille a conduit à l'activation d'une myogenèse au sein de fibroblastes et de cellules souches mésenchymateuses (Murry *et al* (1996)). L'identification de facteurs qui dirigent les cellules vers un phénotype musculaire a permis de mettre en évidence un haut degré de plasticité chez les cellules différenciées. En effet, cela n'avait jamais pu être apprécié auparavant et cela peut mener à l'éventualité qu'une stratégie identique puisse être adoptée pour transformer des cellules qui ne sont pas des cellules musculaires en cardiomyocytes (d'après la revue de Kessler et Byrne (1999)).

3 – Spécifications du muscle cardiaque

Les muscles cardiaques et squelettiques diffèrent par un certain nombre de propriétés fonctionnelles, que nous avons déjà vues au paragraphe précédent. Tout le monde est maintenant d'accord sur le fait que le muscle cardiaque est incapable de se régénérer, alors que le muscle squelettique peut lui se régénérer après un traumatisme (d'après Robinson *et al* (1996)). En fin de grossesse, la synthèse d'ADN peut persister sans division cellulaire, ce qui entraîne l'apparition des cardiomyocytes multi nucléés ; passée cette étape, il n'est plus observé ni synthèse d'ADN, ni division cellulaire pendant le reste de la vie. C'est par hypertrophie et non par hyperplasie cellulaire que le cœur va croître de l'enfance jusqu'à l'âge adulte (d'après Hagège *et al* (1998)). Des cellules souches ou des cellules à visée prolifératives n'ont pu être retrouvées dans les cœurs de mammifères adultes. Quand le tissu cardiaque d'un mammifère adulte est lésé de façon irréversible, les cardiomyocytes ne peuvent pas entrer dans un nouveau cycle cellulaire. Si un nombre significatif de cellules contractiles est endommagé, il s'ensuit un dysfonctionnement myocardique (d'après Robinson *et al* (1996)).

Après une lésion sévère et irréversible du myocarde, de type infarctus par exemple, il va y avoir un remplacement du tissu lésé par une cicatrice fibreuse et un processus identique à celui rencontré lors de la croissance du cœur avec l'âge : une hypertrophie des cardiomyocytes restants. Malgré cela, avec le temps, la contractilité régionale diminue au fur et à mesure que les cardiomyocytes nécrotiques sont remplacés par des fibroblastes et du collagène, et que les cardiomyocytes viables mais hypo perfusés, deviennent moins performants dans leur contractilité, réservant la faible quantité d'oxygène et d'énergie qui est disponible pour le maintien de l'homéostasie cellulaire de base plutôt que pour le fonctionnement mécanique. Ces modifications peuvent être associées à de l'akinésie ou de la dyskinésie sur le segment concerné. Durant le remodelage, la pression de fin de diastole du ventricule gauche augmente, la paroi ventriculaire s'affine et le ventricule se dilate, et c'est à ce moment que le patient peut développer des symptômes

d'insuffisance cardiaque tels que la fatigue, la dyspnée à l'effort et les oedèmes périphériques (d'après la revue de Li *et al* (1998)).

B – De la cardiomyoplastie dynamique à la cardiomyoplastie cellulaire

Antérieurement puis parallèlement aux recherches effectuées sur la cardiomyoplastie cellulaire, un autre type de recherche était mené, s'intéressant toujours au maintien de la fonction cardiaque après une lésion mais cette fois sur le plan organique et non plus cellulaire. Ces recherches sont intéressantes car elles sont la preuve que le modèle canin peut être très utile à l'avancée des études menées pour les maladies cardiaques de l'homme.

1 – Qu'est ce que la cardiomyoplastie dynamique ?

La technique chirurgicale consiste en une dissection et en une transposition dans le thorax de l'ensemble du muscle grand dorsal gauche, que l'on vient positionner autour des deux ventricules. Après quoi, le muscle grand dorsal est régulièrement électrostimulé en synchronisation avec la systole ventriculaire. Le support biologique de cette opération consiste en une électrostimulation chronique du muscle, induisant une adaptation physiologique du muscle squelettique par le muscle cardiaque. Ainsi, le métabolisme glycogénique des fibres musculaires (de type II, rapidement sensible à la fatigue) se transforme peu à peu en un métabolisme oxydatif de type I, résistant à la fatigue (Chachquès *et al* (2002)).

Le matériel permettant la stimulation électronique est constitué d'un pacemaker, d'électrodes de stimulation musculaire et d'une électrode de détection systolique qui permet la synchronisation des contractions musculaires avec les battements cardiaques. De façon à suivre la durée de la contraction systolique, le muscle squelettique doit être électrostimulé en utilisant une suite d'impulsions dont la durée doit être similaire à celle d'une éjection ventriculaire (Chachquès *et al* (2002)).

Chachquès *et al* (2002) rapportent que cette technique a été utilisée sur des patients atteints d'insuffisance cardiaque réfractaire au traitement médical ; 113 cas ont été opérés à l'Hôpital Broussais et à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière et 75 par leur équipe mais à l'étranger, dans le cadre d'un programme de coopération internationale.

2 – Place de la cardiomyoplastie dynamique

Quelques pays développés ont pu bénéficier des programmes concernant la transplantation cardiaque et les systèmes d'assistance circulatoire. Malgré cela, la transplantation cardiaque reste encore très limitée dans beaucoup de pays pour des raisons légales, culturelles ou religieuses, à cause de problèmes de suivi, mais aussi pour des raisons de prix et des risques du traitement immunosuppresseur. Les dispositifs d'assistance circulatoire sont aussi très onéreux, ce qui réduit leur développement (Chachquès *et al* (2002)).

D'autre part, le nombre insuffisant de donneurs d'organe ne permet pas de faire face aux besoins de tous les patients qui nécessitent une transplantation cardiaque. Le nombre de patient sur les listes d'attente continue d'augmenter chaque année, de même que le temps d'attente. Ainsi, il est logique de pouvoir proposer à ces patients, qui ont un haut risque de mortalité, d'autres possibilités thérapeutiques. Avec la cardiomyoplastie_dynamique, la propre musculature du patient est utilisée, ce qui exclue les risques de rejet et, de ce fait, un traitement immunosuppresseur n'est pas nécessaire (Chachquès *et al* (2002)).

La technique chirurgicale de la cardiomyoplastie dynamique est une combinaison entre une chirurgie cardiaque et une chirurgie plastique avec une assistance biomécanique. Son but est de prolonger la vie des patients qui souffrent de sévères déficiences cardiaques chroniques et qui ne sont pas soulagés par des traitements médicaux (Chachquès *et al* (2002)).

3 – Mise en application de la méthode pour des affections d'origine diverses

Une revue de cas menés par l'équipe de Chachquès *et al* (1997) rapporte l'ensemble des interventions survenues entre 1985 (date à laquelle le premier cas clinique de cardiomyoplastie dynamique couronné de succès est rapporté par Carpentier et Chachquès (1985)) et 1995 : 82 patients, âgés de 15 à 72 ans, 69 hommes contre 13 femmes. La période de suivi moyenne a été de 4,2 ans (de 6 mois à 10 ans). Les causes d'insuffisance cardiaque étaient variées : 45 cardiomyopathies ischémiques (dont 11 anévrysmes ventriculaires gauches), 28 cardiomyopathies dilatées, 3 cardiomyopathies consécutives à des chirurgies valvulaires, 5 tumeurs (2 fibromes, 1 lymphome, 1 hémangiome et 1 sarcome) et 1 maladie congénitale. Les techniques chirurgicales ont consisté en 66 renforcements ventriculaires, 15 substitutions de la paroi du ventricule gauche et 1 renforcement de l'atrium droit.

Le taux de survie à 7 ans est de 54 %. 19 patients sont morts durant la période de suivi. Les causes des morts étaient 9 insuffisances cardiaques, 6 morts subites, 2 infarctus myocardiques, 1 apoplexie et 1 saignement gastrique. Durant le suivi des patients, ont été notés une augmentation de la fraction d'éjection, une stabilisation à long terme du diamètre diastolique du ventricule gauche, une baisse de la fonction pulmonaire dans les 2 mois suivant l'intervention mais réversible, une baisse du nombre d'hospitalisations dues à l'insuffisance cardiaque. D'autre part, 5 patients sur les 82, tous des hommes, ont nécessité des transplantations cardiaques car ils souffraient d'une insuffisance cardiaque réfractaire à la cardiomyoplastie_dynamique.

La qualité de vie et la survie à long terme après cette technique chirurgicale semblent être meilleure que celles des patients traités uniquement par soins médicaux. De plus, contrairement à des études contradictoires, la consommation maximale d'oxygène ne semble pas avoir augmenté à long terme. Sachant que les muscles squelettiques sont des organes cibles durant l'insuffisance cardiaque, on pouvait se poser la question de savoir si le muscle grand dorsal n'allait pas se fatiguer plus rapidement. Le problème a été résolu en effectuant un programme adapté d'« entraînement » du muscle grand dorsal 2 mois avant l'intervention, pour éviter son atrophie. Enfin, cette technique paraît effectivement très intéressante mais il ne faut pas oublier que les patients restent sélectionnés

très soigneusement. Ainsi, les premières causes de décès sont l'atteinte pluri organique pré-opératoire, les cardiomyopathies hypertrophiques ou restrictives, les arythmies ventriculaires sévères, les états cliniques et hémodynamiques instables, les maladies neuromusculaires, la cachexie et les insuffisances respiratoires majeures.

Maintenant que ces techniques sont utilisées en pratique chirurgicale sur l'homme, d'autres techniques sont maintenant à l'étude, moins invasive pour le patient, plus supportable en post-opératoire immédiat, telle que la cardiomyoplastie cellulaire. Ces nouvelles techniques n'apportent plus une aide au fonctionnement du muscle cardiaque mais tente de solutionner le problème à sa base.

C – Cardiomyoplastie cellulaire

Le terme de cardiomyoplastie signifie littéralement « greffe dans le muscle cardiaque ». La cardiomyoplastie cellulaire consiste donc en une greffe de cellules au sein du muscle cardiaque. C'est un nouveau concept de thérapie visant à remplacer les cellules musculaires du cœur altérées ou détruites.

1 – Exemple pour différents organes

Le concept de plastie cellulaire a déjà été étudié pour de nombreux organes.

Ainsi, Whittemore et Snyder (1996) rapportent qu'il a été prouvé qu'une lignée cellulaire nerveuse dérivée du système nerveux central (SNC) était extrêmement utile pour la différenciation, la maturation synaptique, la synthèse et la décharge de neurotransmetteur. De plus, il y a des recherches actuelles quant à un potentiel rôle de cette lignée cellulaire dans la réparation ou la thérapie génique du SNC. La capacité de cette lignée à s'intégrer pleinement dans le SNC après transplantation et d'exprimer des gènes étrangers souvent correcteurs, produits in situ, pourrait offrir des approches thérapeutiques potentielles pour certaines maladies neuro dégénératives.

Dans un autre registre, Schmidt et Tietge (1997) ont effectué une revue sur les perspectives de la transplantation cellulaire hépatique. La transplantation hépatique est devenue une intervention chirurgicale courante pour corriger les maladies hépatiques. L'utilisation de transplantation de cellules hépatiques et de la thérapie génique in vivo a augmenté et pourrait finir par remplacer la transplantation hépatique, au moins dans certains cas. La transplantation de cellules hépatiques concerne des hépatocytes intacts et fonctionnels, avec les propriétés métaboliques qui sont déficientes chez le patient receveur. En dehors de ces applications, ce concept peut être utilisé pour la correction de maladies congénitales hépatiques ou d'insuffisance hépatique acquise.

De la même façon, Dabeva *et al* (1997) nous montrent par leurs expériences que la transplantation de cellules souches épithéliales issues d'un pancréas peuvent être transplantées dans

le foie et, sous l'influence de l'environnement, se différencient en hépatocytes fonctionnels, exprimant des protéines spécifiques du foie.

Enfin, Peshavaria et Pang (2000) rapportent qu'il existe peu de connaissances sur l'identité des cellules souches du pancréas. Différents rapports font état de l'existence potentielle de cellules souches pancréatiques et donc de leur éventuelle utilité chez les diabétiques. Cela augmenterait les chances de pouvoir générer des cellules Bêta, productrices d'insuline, ainsi que d'autres types cellulaires des îlots pancréatiques.

2 – Implantation de cellules pour augmenter le nombre de cardiomyocytes.

Avec l'approfondissement des connaissances sur la biologie des cellules de l'organisme, des expériences ont débuté pour corroborer l'hypothèse que des cellules souches musculaires pouvaient être greffées dans un cœur.

Des études, in vitro, ont montré que des cellules transplantées dans un myocarde normal ou infarcté demeuraient vivantes pendant des mois et pouvaient proliférer et se différencier in situ. La présence de disques intercalaires et de protéine connexine-43, un marqueur des jonctions gap, a été démontrée dans un tissu greffé et entre des cellules greffées et des myocytes de l'hôte, dans le cas de transplantation de cellules fœtales. La greffe peut se contracter (spontanément dans le cas de cellules fœtales ou après électrostimulation pour les myoblastes), induire une angiogenèse - qui est bénéfique en cas de maladie cardiaque ischémique - et des réactions locales immunitaires qui sont responsables d'une mort rapide (nécrose, apoptose) d'un nombre variable de cellules allogreffées (d'après la revue de Hagège et Menasché (2000)). Après ce premier aperçu expérimental, la greffe de cellules, dont nous verrons les origines plus tard, paraît donc pouvoir fonctionner, c'est à dire que les cellules greffées sont viables et créent des communications avec les cellules hôtes.

3 – Est-ce « physiologique » que de vouloir régénérer le tissu cardiaque après un infarctus ?

Des études très récentes ont permis d'apporter des modifications quant aux idées en place depuis plusieurs années.

Jusque très récemment, le fait que les myocytes cardiaques cessaient définitivement de proliférer tôt après la naissance et qu'il n'y avait donc plus de renouvellement possible par des nouveaux cardiomyocytes que ce soit physiologiquement ou à la suite d'une lésion était une donnée considérée comme acquise. En fait, les divisions cellulaires (nécessaire pour générer de nouveaux cardiomyocytes) semblaient être bloquées chez l'Homme. Le problème est que ce blocage de prolifération cellulaire semblait être présent uniquement dans le muscle cardiaque humain, comme si les myoblastes squelettiques humains et les cellules cardiaques des autres espèces étaient doués d'un potentiel mitotique largement plus important. Cependant, de nouvelles données rapportées par Dengler et Katus (2002) suggèrent qu'il existe aussi dans le muscle cardiaque humain un niveau basal de prolifération myocytaire après la naissance, aux alentours de 14 par millions de cellules

dans un cœur normal et dix fois plus dans un cœur lésé. Du fait qu'il y ait une perte progressive estimée à $6,4 \cdot 10^6$ cardiomyocytes par an, il apparaît maintenant clairement qu'il y a un très faible turn-over des cardiomyocytes durant toute une vie. Ainsi, il apparaît normal que le contrôle du cycle cellulaire des cardiomyocytes humains soit devenu une priorité dans la recherche ; mais les mécanismes régulateurs intervenant dans les mitoses des cardiomyocytes après la naissance restent encore très largement méconnus.

De la même façon, Dengler et Katus (2002) reviennent sur les données considérées comme acquises dans une étude très récente. Ainsi, à la suite d'un infarctus du myocarde, on pensait les cardiomyocytes incapables de se diviser et de proliférer ; on pensait qu'ils ne pouvaient que s'hypertrophier pour compenser la perte de tissu fonctionnel. Les mécanismes de réparation par prolifération n'auraient été réservés qu'aux cellules vasculaires pour permettre l'angiogenèse et l'artériogenèse pour la formation de vaisseaux collatéraux et qu'aux fibroblastes pour qu'ils puissent remplacer la perte de substance par une cicatrice fibreuse. En fait, il a été montré que la prolifération que l'on vient de citer est aussi présente en période post-infarctus immédiate : des chiffres de 0,08 % pour les myocytes dans la zone infarctée et 0,03 % en bordure de cette zone ont été avancés. Différentes hypothèses ont été posées pour connaître l'origine cellulaire de ces proliférations. Ainsi, des cellules souches dérivées de la moelle osseuse ou des cellules à visée proliférative circulantes pourraient être à l'origine de ces tentatives de réparation. En tout état de cause, ces proliférations ne sont pas suffisantes pour permettre une réparation fonctionnelle des performances cardiaques après un infarctus du myocarde. Mais, face aux différentes objections qui ne manquent pas d'apparaître face à la recherche sur la cardiomyoplastie cellulaire (Gorman et Gorman III (2002)), on a maintenant la preuve que l'organisme tente naturellement de réparer les lésions qui interviennent dans le muscle cardiaque via des cellules souches ou à visée proliférative amenées sur place par des moyens qui restent encore à déterminer.

III – AVANCEES DES RECHERCHES EFFECTUEES SUR LA CARDIOMYOPLASTIE CELLULAIRE

A – Types cellulaires utilisés

La source idéale cellulaire pour une transplantation et une régénération a toujours été à l'origine d'intenses débats scientifiques (et politiques) : quel que soit le but théorique et pratique, les différents types cellulaires cités ici semblent pouvoir tenir leur promesses pour toute application clinique potentielle dans le traitement de lésions du myocarde aigu (ou chronique).

1 – Tentatives de plastie atypique

Au commencement des investigations sur la cardiomyoplastie cellulaire, un des premiers types cellulaires à avoir été testé par Steinhilber *et al* (1990) est la lignée cellulaire issue de souris transgéniques exprimant le facteur natriurétique atrial sous contrôle du gène de fusion T-antigénique SV40 (ANF-TAG). Ces souris développent des tumeurs de l'atrium droit, composées de cardiomyocytes différenciés qui ont la capacité de proliférer. L'étude de cette lignée cellulaire *in vitro* a permis de mieux connaître la structure intrinsèque cardiaque (notion de disques intercalaires

et de myotubes). De plus, cette lignée pourrait être une ressource potentielle expérimentale pour la découverte des gènes régulateurs dans le cycle cellulaire des cardiomyocytes.

Par la suite, d'autres lignées cellulaires du même type ont été étudiées. Ainsi, Claycomb *et al* (1998) ont travaillé sur les cellules HL-1, issues de souris développant des tumeurs atriales à cardiomyocytes. Les cellules gardent, elles-aussi, les propriétés morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques des cardiomyocytes. Elles ont été utilisées pour tester la faisabilité de l'injection de cellules d'origine cardiaque dans le muscle cardiaque. La transplantation syngénique de cette lignée s'est traduite par une survie à long terme du greffon au sein du tissu de l'hôte sans effet négatif associé (Vilquin *et al* (1999)).

Dans un autre registre, Makino *et al* (1999) ont isolé une lignée cellulaire cardiomyogénique dans les cellules stromales de la moelle osseuse de souris. Les cellules stromales ont été immortalisées par traitement à la 5-azacytidine. Les cellules montrent une morphologie de fibroblastes, mais la morphologie change avec le traitement à la 5-azacytidine sur environ 30 % des cellules. Elles se connectent avec les cellules voisines après une semaine, forment des structures ressemblant à des myotubes après 2 semaines et battent de façon synchrone après 3 semaines. Elles expriment les peptides natriurétiques atrial et cérébral. En bref, elles présentent une structure totalement semblable à celle de cardiomyocytes et pourraient devenir un nouveau modèle pour permettre de comprendre la différenciation des cardiomyocytes.

Enfin, des tentatives de thérapies par injection de facteurs de croissance ont été tentées. Par exemple, Watanabee *et al* (1998) ont comparé l'injection de facteurs de croissance FGF-2 dans un myocarde lésé, associé ou non à l'injection de différents types d'héparine. Les résultats sont évalués par le nombre de capillaires présents à la suite des différentes injections. Ainsi, c'est l'association FGF-2 et héparine qui donnent les meilleurs résultats.

2 – Cardiomyocytes et cellules souches fœtaux et néonataux

On a pu isoler et mettre en culture des cardiomyocytes issus de fœtus de souris, de rat, de chien et d'homme. Ces cellules ont la capacité de proliférer *in vitro* et de réarranger leurs sarcomères. Elles finissent par pouvoir se contracter régulièrement et spontanément de manière synchrone. Des connections apparaissent entre les cellules (disques intercalaires), formant ainsi une architecture tissulaire proche de celle du tissu cardiaque (Hagège *et al* (1998)).

Une fois cette donnée acquise, des essais d'implantation de cardiomyocytes fœtaux de souris ont été tentés. Ainsi Soonpaa *et al* (1994) rapportent avoir implanté des cardiomyocytes fœtaux issus de souris transgéniques (porteuses du gène rapporteur β -galactosidase modifié) dans des cœur sains. Par identification de la β -galactosidase, on différencie les cardiomyocytes greffés des cardiomyocytes hôtes : les cellules greffées sont observables jusqu'à 2 mois post-implantation, date du dernier sacrifice. Le développement de greffons intra myocardiques n'entraîne pas d'effet négatif sur le myocarde hôte et n'est pas associé à un rejet chronique. La microscopie électronique révèle la présence de disques intercalaires présents entre les cardiomyocytes fœtaux greffés et les cardiomyocytes hôtes. On a donc une preuve de la faisabilité de ce type de greffe sur cœur sain.

Par la suite, le même type d'expérience a été mené par la même équipe (Koh *et al* (1995) sur des cœurs sains de chiens dystrophiques, pour voir si le concept était reproductible sur grands animaux. De la même façon, on a pu mettre en évidence des greffes stables dans le cœur des chiens.

D'autre part, cette équipe (Klug *et al* (1996) a travaillé sur une manipulation simple qui permettait d'obtenir une culture de cellules souches embryonnaires relativement pure à partir de la lignée de souris transgéniques de Soonpaa *et al* (1994). Une fois ces cellules implantées dans des cœurs de souris dystrophiques, on a pu suivre leur évolution comme lors de la première expérience, et visualisée que les cellules souches se différencient bien en cardiomyocytes sous l'influence du milieu et qu'on avait des greffes stables jusque 7 semaines post-implantation.

L'étape suivante a été la création de modèle de lésion myocardique pour parvenir à connaître le devenir de ces cellules dans un environnement qui ressemble le plus possible à une lésion d'infarctus du myocarde. Des lésions ont été induites par le froid ; des études de faisabilité et d'efficacité ont été menées suite à des implantations de cardiomyocytes fœtaux au sein de ces lésions. Leor *et al* (1996) ont mené une série d'expériences permettant de comparer différents protocoles. Ainsi, ils ont effectué 3 séries en parallèle : dans des myocordes lésés par le froid, ils ont injecté soit des fragments de tissu de ventricules fœtaux humains en culture (rats transplantés recevaient des injections de cyclosporine), soit des fragments de tissu de ventricules fœtaux de rats en culture, soit du sérum physiologique (contrôle). En conclusion, cette étude a montré que le tissu cardiaque foetal peut être implanté et survivre (au moins 2 mois, la durée de l'étude) dans un myocarde infarci.

Jia *et al* (1997) ont mené une étude comparative qui montre que l'implantation de cardiomyocytes fœtaux de rats dans un myocarde lésé par le froid limite l'expansion de la cicatrice fibreuse.

Enfin, la dernière orientation de recherche sur ce sujet était de savoir si après implantation de cardiomyocytes fœtaux dans une lésion mimant l'infarctus du myocarde, on avait une augmentation de la fonction de ce cœur. Ainsi, Scorsin *et al* (1997) ont effectué les même type de manipulation que cités précédemment puis ont vérifié au bout d'un mois post-transplantation le fonctionnement cardiaque par échocardiographie. Une augmentation de la fonction ventriculaire gauche a été montrée par une fraction d'éjection et une éjection cardiaque significativement plus élevée.

Les dernières études prennent en compte des détails omis par les études précédentes et réinsiste sur le fait que seul les cardiomyocytes fœtaux sont greffés avec succès. Ainsi, Reinecke *et al* (1999) font une comparaison entre l'implantation de cardiomyocytes fœtaux, néonataux et adultes dans des myocordes normaux, dans des myocordes récemment lésés par le froid ou dans des myocordes en cours de cicatrisation (dans un tissu de granulation). En conclusion, les cardiomyocytes fœtaux et néonataux forment des greffes stables de façon identique dans les trois types de tissus myocardiques alors que les cardiomyocytes adultes ne s'implantent dans aucun cas. Enfin, Roell *et al* (2002a) ont prouvé que l'implantation de cardiomyocytes fœtaux augmentait la fonction cardiaque et le taux de survie en cas de lésion myocardique.

3 – Myoblastes

Suite aux données biologiques connues concernant les cellules satellites des muscles squelettiques, les premières phases d'expérimentation étaient axées sur l'éventualité de transplanter ces cellules. Parmi d'autres, Alameddine *et al* (1989) ont décidé de tester *in vivo* la myogénicité de cellules satellites autologues qui se multipliaient parfaitement *in vitro*. Ainsi ils ont effectué des auto-transplantations de cellules satellites dans des muscles. Effectivement, ils ont pu constater que les cellules satellites conservent leur caractère myogénique et que ces cellules étaient capables de former des fibres musculaires totalement différenciées.

De la même façon que pour les cardiomyocytes fœtaux, l'étape suivante a permis de savoir si le fait d'implanter des myoblastes dans un myocarde sain était faisable. Ainsi, Koh *et al* (1993) ont implanté des myoblastes C2C12 dans des myocordes de souris transgéniques afin d'évaluer si ces myoblastes pouvaient former des greffes stables, si ces myoblastes conservaient la capacité de se multiplier et de se différencier et si la présence de ces myoblastes avait un effet délétère sur la fonction cardiaque. Leurs études ont permis de mettre en évidence que les myoblastes C2C12 se différencient en myotubes quand ils sont greffés dans le cœur, qu'ils ont pu rentrer dans des cycles cellulaires et donc se multiplier et qu'il n'y a pas eu d'effet particulier de la greffe sur la fonction cardiaque. Cette première série d'expérience nous permet de dire que l'implantation de myoblastes au sein d'un myocarde est possible et que la greffe paraît s'intégrer complètement dans son environnement.

Par la suite, Chiu *et al* (1995) ont amélioré la pertinence des modèles cellulaires et expérimentaux. Dans un modèle canin dont le myocarde a été cryolésé, les auteurs ont utilisé les propres myoblastes de l'animal, obtenus par culture cellulaire d'une biopsie du muscle tibial antérieur. La formation de structures de type musculaire squelettique au sein du myocarde a été mise en évidence par histologie, démontrant ainsi la faisabilité de la transplantation autologue de myoblastes adultes dans le myocarde.

Par ailleurs, après avoir greffé des myoblastes marqués, Dorfman *et al* (1998) ont confirmé que ce sont bien les cellules satellites, formant de nouvelles fibres musculaires striées, qui sont à l'origine de la régénération musculaire et qu'elles ont la capacité de survivre dans un environnement myocardique.

Enfin, la fonctionnalité des greffes réalisées a été plus particulièrement étudiée par Taylor *et al* (1998). Ils ont étudié les performances cardiaques dans un modèle lapin dont le myocarde avait été infarci par le froid puis dans lequel des myoblastes avaient été implantés. Les différentes analyses histologiques pour s'assurer que la greffe était bien intégrée ont été effectuées. Les données ont permis de démontrer pour la première fois qu'on peut obtenir une augmentation des performances myocardique en systole et en diastole en transplantant des myoblastes squelettiques autologues dans un cœur lésé.

Suite à ces études de fonctionnalité, de nouvelles questions furent soulevées : ainsi, il n'a jamais été montré clairement que l'augmentation des performances d'un cœur dans lequel des myoblastes avaient été implantés était uniquement due au tissu apparu consécutivement à la greffe de myoblastes ou si de tels résultats pouvaient être obtenus avec d'autres types cellulaires. De ce fait, Hutcheson *et al* (2000) ont effectué une comparaison entre l'implantation de myoblastes et l'implantation des fibroblastes dans un myocarde lésé. Les résultats montrent que, quel que soit le type de cellules (contractiles ou non), on observe une augmentation des propriétés de la matière et de l'intégrité structurale de la région lésée, démontrée par l'augmentation des performances diastoliques. Cependant, seuls les myoblastes ont la faculté d'augmenter les performances systoliques dans la région endommagée. Donc, seuls les myoblastes sont réellement efficaces quant à l'amélioration des performances hémodynamiques générales.

B – Techniques chirurgicales utilisées

Au-delà du choix du type de cellules à utiliser, c'est tout un protocole qui est à définir pour permettre d'optimiser la réussite de toute transplantation cellulaire. Nous allons tenter de décrire le plus précisément possible toutes les étapes de ces protocoles.

1 – Cultures cellulaires

On a vu que les 2 principales sources de cellules retenues pour la cardiomyoplastie étaient les myoblastes et les cardiomyocytes fœtaux. On va d'abord voir de manière générale comment on procède pour faire une culture cellulaire de myoblastes puis on verra ensuite les particularités des cardiomyocytes fœtaux.

Le muscle strié squelettique adulte est capable de se régénérer à partir de cellules myogéniques qui sont en position satellites des fibres musculaires. Chez le fœtus de rat, il y a 20 % environ de cellules satellites par rapport au nombre total de cellules musculaires ; après la naissance, il n'est plus que de 10 % et de 2 % chez l'adulte. Ces données, qui peuvent être généralisées à l'ensemble des mammifères, doivent être prises en considération en fonction de l'âge, pour déterminer la quantité de muscle qui doit être dissociée pour obtenir une densité suffisante de cellules myogéniques.

Les cellules satellites ont au moins 2 rôles connus : assurer la régénération musculaire en cas de lésion du muscle et permettre l'augmentation du nombre de noyaux de la fibre au cours de l'accroissement en longueur du muscle. Dans le muscle squelettique sain, les cellules satellites sont plus ou moins quiescentes. En revanche, toute agression, quelle qu'elle soit (trauma, dissociation enzymatique, exposition aux milieux de culture...) entraîne une prolifération intense des myoblastes.

La première étape est donc le prélèvement des muscles. Il s'effectue sur animaux anesthésiés. Les muscles sont ensuite rincés à plusieurs reprises, débarrassés de leurs gaines conjonctives (épimysium et pérимыsium) afin de permettre une action optimale des enzymes protéolytiques et mis en suspension dans du PBS (solution saline). Puis, après rinçage et centrifugation, les muscles sont

mis en contact avec de la collagénase, qui permet de dissocier l'endomysium (collagène strié) qui unit les fibres musculaires entre elles. Puis les fibres sont, à nouveau, rincées et centrifugées à plusieurs reprises. Elles sont ensuite mises en contact avec de la trypsine qui permet d'isoler les cellules myogéniques. Des difficultés peuvent être rencontrées tels qu'une suspension trop visqueuse (trop de fibres musculaires au départ, nécessité de diluer), une dissociation insuffisante par les enzymes (attention au pH), une contamination par des hématies (lavage initial doit être soigné). Puis les cellules sont mises en culture à proprement parler. Des récipients (boîtes de Pétri, flacons, plaques...) et supports de culture (plastique traité, traitement des récipients par la gélatine...) adaptés doivent être utilisés. Les cultures sont placées dans un incubateur à 37°C, contenant une atmosphère d'air-CO₂ à 5 % saturée en vapeur d'eau. Les milieux sont renouvelés tous les 2 à 3 jours selon la densité des cellules, fin d'éviter que les myoblastes ne fusionnent entre eux. Une fois que le nombre de myoblastes souhaités est atteint (comptages réguliers), on peut envisager un transport pour la transplantation mais il faut tenir compte de la mort cellulaire qui survient durant tout transport cellulaire (Gautron).

En ce qui concerne les cardiomyocytes, qu'ils soient d'origine fœtale ou adulte, le procédé est très similaire. Il n'y a que le prélèvement qui va varier. En effet, le prélèvement se fait sur des fragments de cœurs de fœtus ou d'adultes (Van Meter *et al* (1995)).

2 - Origine des lésions myocardiques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, dès qu'il s'agit de tester la fonctionnalité de la transplantation d'un type cellulaire dans un myocarde lésé d'animal d'expérimentation, il faut généralement créer cette lésion. Pour cela, différentes techniques ont été mises en place.

La plus ancienne des méthodes consiste en une occlusion temporaire (60 minutes) d'une artère coronaire, généralement l'artère coronaire gauche, durant un temps donné, de manière à entraîner une ischémie (Scorsin *et al* (1997)). Cette ischémie est objectivée par la modification typique du segment ST sur l'ECG et par des arythmies ventriculaires.

Une autre méthode consiste à créer une lésion par le froid ou cryolésion. Pour cela, on utilise un disque en cuivre de 3 ou 5 cm de diamètre monté sur une sonde refroidi par de l'azote liquide circulant à l'intérieur. L'azote liquide est envoyé par un procédé donné (marques déposées) jusqu'à la sonde et refroidit le disque de cuivre jusqu'à des températures de - 160°C. Le disque est appliqué fermement sur la paroi antérieure du ventricule gauche dans une zone relativement dépourvue de vaisseau sanguin, c'est à dire entre l'artère descendante antérieure gauche et la première branche diagonale de l'artère descendante antérieure gauche. Le temps d'application varie de 20 à 25 minutes. Durant ce temps, la pression artérielle est mesurée et la pression appliquée par la sonde thermique sur le ventricule gauche varie régulièrement en réponse aux modifications de la pression systémique. A la suite de l'application de la sonde, on peut généralement reconnaître l'endroit où le muscle a été infarci, il apparaît comme une zone cyanosée sombre à la surface du ventricule gauche (Chiu *et al* (1995)). On peut adjoindre à la technique une injection préventive d'héparine (100 UI/kg) pour éviter la formation de thrombus et commencer une perfusion de lidocaïne (35 µg/kg/min) qui sera continuée 12h après l'intervention pour éviter les arythmies (Marelli *et al* (1992)). Cette

méthode a été pendant longtemps étudiée de façon à déterminer les meilleures caractéristiques et ces caractéristiques restent encore très controversées (Christlieb (1996)).

Une des dernières techniques de création de lésion myocardique a été décrite par Rajnoch *et al* (2001). Elle consiste en une injection simple de toxine de serpent dans le myocarde pour entraîner la lésion. En fait, la toxine du cobra *Naja mossambica mossambica* est connue pour causer une nécrose musculaire. L'étude histologique montre que les cardiomyocytes sont remplacés par des fibroblastes et des adipocytes, ce qui ressemble beaucoup à ce qu'on rencontre en cas de dysplasie.

Enfin, il existe des techniques peu invasives pour créer des lésions plus ou moins étendues dans le myocarde qui consiste à injecter des substances corrosives dans les artères coronaires telles que l'adriamycine ou la doxorubicine (Suzuki *et al* (2002)). Le problème est qu'une injection ne suffisant pas, on doit effectuer plusieurs injections à la suite et contrôler par divers moyens l'importance des lésions induites.

Si on effectue une comparaison de différentes techniques, l'avant-dernière présente l'avantage de ne nécessiter qu'une simple injection. La dernière est la moins invasive car elle ne nécessite qu'un cathétérisme des artères coronaires. De plus, elle permet de mimer pour la première fois, des lésions étendues du myocarde. On reproche à la méthode par le froid de prendre énormément de temps et d'entraîner des risques accrus de fibrillation ventriculaire. De plus, des résultats controversés ont été obtenus avec cette méthode qui créerait des lésions transpariétales. Certains trouvent que la cicatrice est quasi-transpariétale (Marelli *et al* (1992)) et d'autres que les lésions de refroidissement-réchauffement entraîne une nécrose dans le péricarde avec un myocarde viable et ne sont donc pas transpariétales (Murry *et al* (1996)). D'autres encore rapportent avoir obtenu une cicatrice transpariétale totale (Taylor *et al* (1998)). Enfin, les problèmes de l'occlusion de l'artère coronaire, et les raisons pour lesquelles c'est une méthode qui n'est plus très utilisée, sont que la taille de la cicatrice est variable, le taux de mortalité est haut et que la nécrose des cellules musculaires est incomplète (Li *et al* (1997)). Toutes ces techniques présentées sont bien utiles pour l'expérimentation mais on se rend compte qu'elles entraînent des biais importants et que de ce fait, un modèle physiologique de pathologie cardiaque reste le modèle de choix pour éviter les artéfacts expérimentaux.

3 – Techniques permettant l'implantation des cellules greffées dans myocarde

Durant l'évolution des recherches en cardiomyoplastie cellulaire, une fois que les questions de faisabilité et de fonctionnalité ont été traitées, sont apparus des problèmes plus techniques tels que l'incidence du mode d'injection des cellules greffées sur les résultats obtenus.

Pendant très longtemps, l'injection était faite de visu, d'abord dans le myocarde sain, l'endroit étant souvent marqué par une suture, puis au sein de la cicatrice fibreuse induite, car celle-ci est toujours visible. L'avantage de cette technique était que l'injection entraîne un faible trauma, que des injections multiples étaient possibles et qu'on pouvait maîtriser le nombre de cellules implantées, le site d'implantation... Les recherches avançant, on s'est rendu compte qu'il existait une mortalité non négligeable des animaux utilisés pour l'expérimentation à la suite des

thoracotomies, que ce soit pour la lésion induite du myocarde ou pour l'injection des cellules greffées.

Afin d'éviter ces fortes mortalités, différents groupes ont tenté d'améliorer ces techniques. Ainsi, par exemple, Roell *et al* (2002b) ont travaillé récemment sur la réalisation d'un système permettant des injections dans la paroi d'un cœur qui bat, sans qu'il y ait de lésions induites par ces injections (une des causes de mortalité). Ce système a une forme elliptique qui permet l'immobilisation partielle du cœur et qui contient une rigole évidée ayant une direction tangentielle, faite pour recevoir l'aiguille servant à injecter et qui assure une orientation et une profondeur de pénétration appropriées. Ce système a été testé et a permis une réduction de mortalité de 50 %.

De plus, Taylor *et al* (2002) ont développé une technique qui permettrait de se passer de la thoracotomie, le temps le plus délicat des interventions. Cette technique consiste à cathétériser sélectivement l'artère coronaire pour effectuer une injection de myoblastes directement dans le ventricule gauche. Ils ont comparé cette technique avec l'injection directe intra-pariétale. Après l'injection directe, les myoblastes sont largement distribués dans la paroi myoardique, avec un nombre plus important de ces myoblastes concentrés autour des sites d'injection. Cependant, les myoblastes ont été retrouvés jusque 5 à 7 mm des sites d'injection démontrant le pouvoir de migration des myoblastes au sein du myocarde. D'autre part, une infiltration de lymphocytes a pu être observé à la suite de l'injection directe, sûrement due à l'aiguille introduite. Enfin, l'injection directe de trop gros volume (nombre important de cellules) entraîne un blanchiment de la paroi ventriculaire, une bradycardie et parfois même, la mort. En ce qui concerne la cathétérisation de l'artère coronaire, des myoblastes ont été détectés dans les 3 couches de la paroi libre du cœur et dans le muscle papillaire. Il n'y avait pas de réaction inflammatoire associée à cette technique (dilution, absence d'aiguille ?). Chronologiquement, les myoblastes ont d'abord été retrouvé le long des vaisseaux sanguins, puis ils sont apparus de façon diffuse et ponctuelle, comme s'ils avaient traversé la paroi des vaisseaux et étaient venus migrer au sein du myocarde. En résumant les différentes données, le nombre total de myoblastes décelés au bout de 17 jours est plus élevé après l'injection directe qu'après l'envoi des myoblastes dans le ventricule gauche. Cependant, ces données indiquent aussi que les myoblastes paraissent plus dispersés dans le myocarde après leur envoi dans le flux sanguin. D'autre part, du fait qu'il n'est pas apparu de signe d'inflammation ou trace de lésion à la suite de l'envoi des myoblastes dans le courant sanguin, il est possible d'augmenter le nombre de myoblastes libérés. En bref, cette technique de cathétérisation de l'artère coronaire est une voie à explorer pour limiter le côté invasif des thoracotomies.

C – Discussion des résultats

Nous allons tenter de faire ici la synthèse des différentes techniques qui ont été rapportées plus haut et afin de mettre en évidence les avantages et les inconvénients de chacune.

1 – Détails concernant la technique de cardiomyoplastie cellulaire

Quand on est confronté avec un problème de lésion myocardique, le remplacement des myocytes semble être le seul traitement causal adapté, car la régénération de tout le tissu cardiaque

perdu par nécrose peut éviter les conséquences fâcheuses du remodelage du coeur. Mais avant de s'intéresser au type de cellule réimplanté, il ne faut pas oublier quelques principes de bases pour cette transplantation. D'abord, pour obtenir une augmentation des performances cardiaques, l'injection de cellules doit se faire précocement après la lésion, si on veut que l'organisme survive à l'agression aiguë qui modifie la fonction cardiaque. Dans le cas où il y aurait des lésions chroniques du muscle cardiaque, la prolifération doit se faire de façon lente mais continue durant l'évolution de la lésion.

D'autre part, quelle que soit la source de cellules implantées et la façon dont elles sont implantées, une revascularisation doit être concomitante à la procédure, de manière à permettre la viabilité de la région et prévenir la formation de la cicatrice fibreuse.

Enfin, le tissu myocardique nouvellement formé doit s'intégrer dans le tissu déjà en place s'il veut assurer la fonction du tissu qu'il remplace. Tout ceci doit se mettre en place alors que le cœur continue de battre. De plus, de simples petites portions de tissus mal intégrés à leur environnement peuvent sévèrement altérer la conduction électrique et les contractions du cœur, avec des conséquences dans le traitement à long terme (Yoon *et al* (1995)).

2 – Avenir de la cardiomyoplastie cellulaire

a - La voie des cardiomyocytes

L'expansion massive des cardiomyocytes adultes autologues représenterait la situation optimale. Cependant, en l'état actuel de nos connaissances, la stimulation de la capacité proliférative de ces cellules n'est pas encore réalisable. Une solution intermédiaire consisterait à forcer la différenciation cardiogénique de cellules autologues relativement indifférenciées telles que les fibroblastes, mais cette fois encore les mécanismes promoteurs de cette différenciation ne sont pas encore tous connus ou contrôlés.

b - La voie des cellules satellites

Les résultats encourageants obtenus à l'aide de modèles animaux de petite et moyenne taille devraient maintenant laisser la place à des études de faisabilité sur le gros animal dans des modèles hôtes physiologique. Ces études devraient permettre le développement de techniques de production de cellules à grande échelle. L'évolution histologique et fonctionnelle des greffons pourrait alors être suivie à court et long terme, dans la perspective d'envisager des protocoles d'essais cliniques restreints à des indications bien précises. De tels transferts de technologies sont à l'étude actuellement.

c - La voie des cellules souches

Le stroma médullaire contient des cellules souches indifférenciées à très fort potentiel prolifératif. Parmi ces cellules pourraient se trouver des précurseurs des cardiomyocytes ou des cellules satellites, dont la différenciation serait dépendante des conditions de croissance et d'interactions avec le milieu environnant. Placées dans des conditions de culture adéquate, encore à définir, ces cellules stromales pourraient ainsi constituer des stocks de cellules transplantables.

Les cellules souches embryonnaires, récemment obtenues chez l'homme et chez la souris, proviennent d'un embryon aux premiers stades de sa formation. Chaque cellule est donc capable de donner naissance à l'ensemble des tissus de l'organisme en fonction des conditions de développement extérieures. La manipulation des conditions de culture permet l'obtention de cardiomyocytes. Ainsi, Klug *et al* (1996) ont obtenu des cardiomyocytes de souris par sélection en cultures de cellules souches embryonnaires. Injectés dans le myocarde de souris, ces cardiomyocytes se sont intégrés avec succès. En combinant les avancées du clonage humain puis des manipulations de cellules embryonnaires, des cardiomyocytes autologues humains pourraient être préparés dans la perspective d'une transplantation. Ce genre d'approche ne pourra cependant être envisagé dans un avenir immédiat compte tenu des questions éthiques considérables soulevées d'une part par le clonage humain et d'autre part par la manipulation des embryons humains. Enfin, les conditions techniques de production des cellules pourraient être incompatibles avec l'urgence clinique des lésions ischémiques à traiter.

3 – Autres techniques utilisées récemment

Actuellement, tous les avantages que l'on peut attendre des différentes techniques de cardiomyoplastie cellulaire ont été mis en évidence. Pour la suite des recherches, des problèmes éthiques vont se poser et tant que ses problèmes ne seront pas résolus, beaucoup de pistes ne pourront pas être prolongées. Malgré cela, de nouvelles orientations apparaissent.

Ainsi, Suzuki *et al* (2002) ont implanté des fibres musculaires simples de rat en 4 sites (4 x 1 fibre) dans un myocarde infarci artificiellement pour étudier le devenir de ces fibres. In vitro, les myoblastes se dissocient de leur fibre isolée, prolifèrent et se différencient en myotubes multi nucléés. In vivo, 3 semaines après la greffe, les fibres initiales ont disparu et sont à l'origine de l'apparition de myoblastes. A 4 semaines, on observe des plages de très petite taille où des myotubes multi nucléés sont visibles. De plus, la transplantation d'une fibre musculaire permet l'augmentation significative de la fonction cardiaque. Cette nouvelle approche évite toute la perte de temps quant à la culture cellulaire, ce qui peut permettre sa mise en œuvre très tôt après une phase ischémique, par exemple.

Jusqu'à aujourd'hui, les expérimentations sur la cardiomyoplastie cellulaire précédemment décrites n'étaient faites que dans le cadre de modèles expérimentaux dont les lésions avaient été induites. Pour la première fois, Yoo *et al* (2000) ont pu dresser des conclusions identiques sur un modèle de hamsters (BIO 53.58) qui ont la particularité de souffrir d'une cardiomyopathie dilatée. Ainsi, dans le premier groupe, ils tentent d'implanter des cellules musculaires lisses autologues

(originaires du canal déférent) dans le myocarde. Ils observent une prévention de la dilatation cardiaque et une augmentation de la fonction ventriculaire. Ensuite, ils voulaient voir l'effet exact de l'implantation des cardiomyocytes adultes dans le cœur de ces hamsters. Ainsi, ils ont effectué une comparaison entre l'implantation de ces cardiomyocytes et une injection de sérum physiologique. Ils ont pu observer, suite à l'implantation des cardiomyocytes, la formation d'un nouveau tissu myocardique fonctionnel au sein du myocarde cardiomyopathique et une augmentation de la fonction contractile de ce myocarde. On peut donc conclure que, pour la première fois, des expérimentations ont été réalisées sur des modèles hôtes physiologiques et que toutes les conclusions faites précédemment s'y appliquent de la même manière.

CONCLUSION TRANSITION

La recherche sur la cardiomyoplastie cellulaire est arrivée à un tournant. En effet, les problèmes éthiques qui se posent empêchent la poursuite des recherches sur les cardiomyocytes fœtaux et les cellules souches sur embryon. D'autre part, en 1998, quand cette étude a débuté, aucun essai de greffe cellulaire cardiaque n'avait été mené sur des hommes ou même des animaux atteints spontanément d'anomalie cardiaque. Nous nous sommes donc interrogé sur l'utilisation de cette technique sur des chiens atteints physiologiquement de cardiomyopathie dilatée. En effet, estimant que cette technique était très prometteuse, nous avons mené cette étude avec un double but : d'abord, dans l'objectif de pouvoir améliorer le pronostic de chiens dont l'espérance de vie était très faible, et ensuite, de permettre de faire avancer la recherche humaine en utilisant un modèle animal mimant parfaitement la maladie humaine.

BUT DE L'ETUDE

Le but de l'étude que nous présentons a été de réaliser pour la première fois des cardiomyoplasties cellulaires chez le chien atteint de cardiomyopathie idiopathique.

Cette étude a comporté les étapes suivantes :

- 1 – Mise au point d'une technique fiable et reproductible de culture primaire de myoblastes de chien.
- 2 – Mise au point d'une technique de conservation, de préparation et de transport des cellules
=> Ces deux premiers points seront présentés dans la première partie du travail personnel de la thèse.
- 3 – Evaluation des effets cliniques et hémodynamiques de l'implantation intramyocardique.
- 4 – Etude du devenir histologique des zones greffées : incorporation des cellules à la structure myocardique, différenciation et éventuel degré de prolifération.
=> Ces deux points feront l'objet de la seconde partie du travail personnel de la thèse.

PROTOCOLE

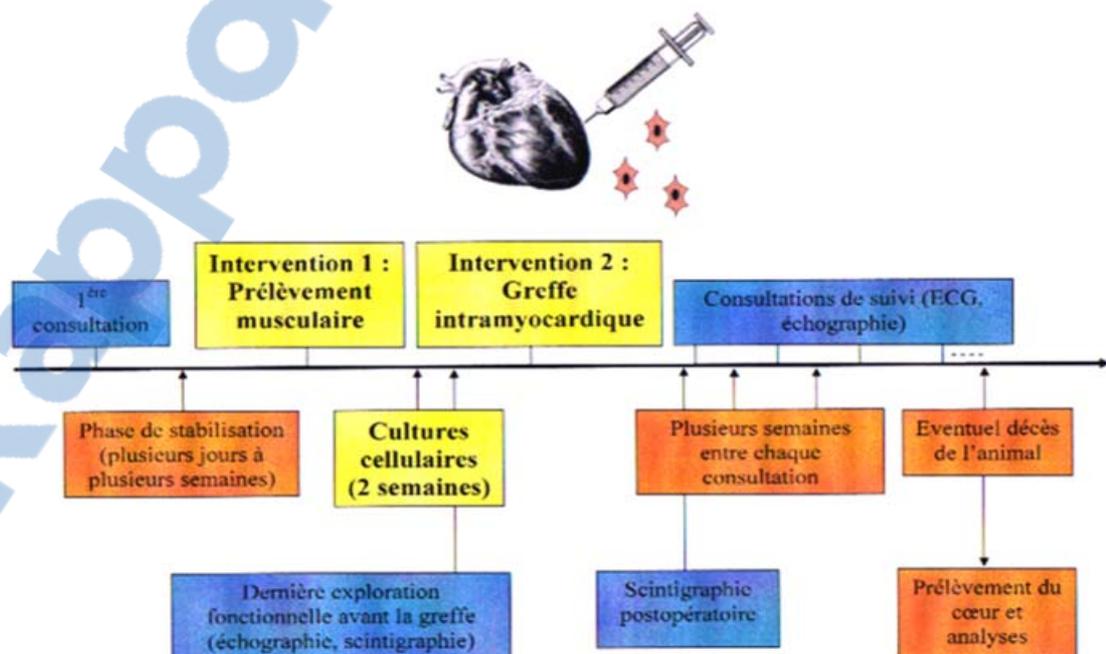
Les animaux inclus dans ce protocole ont été amenés en consultation de cardiologie à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort (ENVA). Après la confirmation du diagnostic de cardiomyopathie dilatée idiopathique, ces animaux ont été stabilisés médicalement pendant le nombre de semaines nécessaires avant d'être inclus dans le protocole.

Le principe de la cardiomyoplastie cellulaire pratiquée reposait sur deux interventions pour chaque animal : la première intervention a consisté en un prélèvement du muscle sartorius sur le membre postérieur gauche. Après environ deux semaines de cultures cellulaires et l'isolement des myoblastes en quantité suffisante (au moins 5.10^7 cellules), une deuxième intervention a permis l'implantation intramyocardique par thoracotomie intercostale gauche.

L'évaluation pré- et postopératoire de la fonction cardiaque a compris un électrocardiogramme, un cliché radiographique du thorax, une exploration biologique (numération et formule sanguine, bilan biochimique), une mesure de la pression artérielle, une série d'échocardiographies et une scintigraphie myocardique au thallium.

Une autopsie a été pratiquée sur les animaux décédés au cours du protocole. Les cœurs ont été prélevés et préparés pour une analyse anatomo-pathologique (voir Figure 3 et Figure 21)

Figure 3 : Résumé du protocole de cardiomyoplastie cellulaire



DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE CULTURE DE MYOBLASTES DE CHIEN

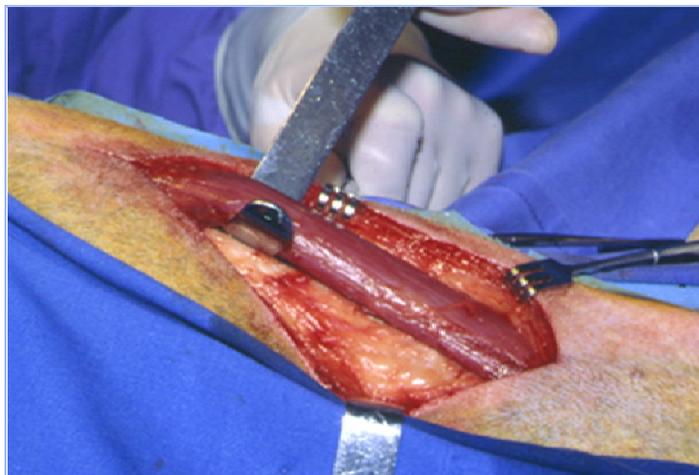
I – MATÉRIELS ET MÉTHODES

A - Prélèvement musculaire

Des biopsies ont été préalablement pratiquées sur des chiens sains (n=4) au cours de diverses interventions chirurgicales sans rapport avec ce protocole. Les fragments prélevés ont donc varié en taille et en origine musculaire (muscle droit de l'abdomen, erector spinae, fléchisseur superficiel des doigts, biceps fémoral). Ces biopsies ont permis la mise au point de la technique de culture de myoblastes avant de prélever les chiens atteints de cardiomyopathie dilatée (CMD). La technique anesthésique utilisée est la même que celle employée pour la deuxième intervention (implantation intramyocardique) et est détaillée dans la deuxième partie : “TRANSPLANTATION CELLULAIRE INTRAMYOCARDIQUE CHEZ DES CHIENS ATTEINTS DE CARDIOMYOPATHIE DILATÉE, paragraphe I-B: Anesthésie”.

Les chiens atteints de CMD (n=4) ont été placés en décubitus dorsal avec les membres postérieurs en extension. Le chef crânial du muscle sartorius (anciennement couturier) a été exposé par une incision cutanée en regard de ce muscle, sur la face crâniale de la cuisse gauche (voir Photo 1). Après l'incision du fascia recouvrant cette région, un soin particulier a été appliqué pour ne pas endommager le muscle prélevé. Le prélèvement a été nettoyé du tissu adipeux et fibreux l'entourant avant d'être stérilement transféré dans un milieu de transport : DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCOND), refroidi à 4°C. Les différents plans ont été fermés successivement de manière classique.

Photo 1 : Prélèvement du chef cranial du muscle sartorius (cliché : N Borenstein)



B - Analyses histologiques

Deux biopsies ont été réalisées sur chaque muscle prélevé pour une analyse histologique ; les biopsies ont été montées sur un support de bois entre deux aiguilles de 25 G pour éviter une rétraction et de potentielles lésions histologiques artéfactuelles. Un fragment a été fixé dans du formol dilué au 1/10^{ème} pour la microscopie optique, le deuxième a été fixé dans du glutaraldéhyde 2,5% pour la microscopie électronique.

1 - Microscopie optique

Après avoir subi une déshydratation dans 3 bains d'alcool successifs à 70%, 90% et 100% puis dans du toluène, la biopsie a été incluse en paraffine puis coupée à 5 µm d'épaisseur au microtome. Les coupes ont été enfin colorées par hématoxyline-éosine-safran puis observées avec un microscope optique (ZEISSND).

2 - Microscopie électronique

Les fragments de muscles ont été fixés dans du glutaraldéhyde 2,5% dans du PBS pH 7,4, 0,1M, pendant 48 heures. Ils ont été post-fixés dans du tétroxyde d'osmium 1% puis déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante (45%, 70%, 90% et 100%) avant d'être inclus dans de la résine EponND. Après polymérisation de la résine, des coupes semi fines de 2 µm d'épaisseur ont été colorées par du bleu de toluidine et observées en microscopie optique pour rechercher des foyers d'infection.

En l'absence de foyer d'infection repéré, deux blocs ont été systématiquement coupés pour la microscopie électronique : des coupes ultrafines de 70 nm d'épaisseur ont été contre colorées par l'uranyl et le plomb. L'observation a été faite avec un microscope électronique à transmission EM 10 (ZEISSND).

C - Préparation du prélèvement pour l'extraction des myoblastes

Après la biopsie, le muscle a été rapidement transporté pour être traité mécaniquement et par des enzymes de manière stérile.

Le muscle a été pesé puis placé dans une boîte de Pétri ouverte sous hotte où le muscle a été libéré de ses enveloppes fibreuses. Le corps charnu restant a ensuite été pesé puis haché mécaniquement avec des ciseaux à iridectomie. Des fragments du produit obtenu ont été prélevés pour culture d'explant ; le reste a été gardé pour deux techniques de digestion enzymatique.

D - Techniques de culture de myoblastes

Trois techniques de culture primaires de myoblastes de chien ont été pratiquées sur les muscles prélevés. Ces trois techniques varient sur le traitement des prélèvements musculaire pour l'obtention des myoblastes : culture à partir de petits fragments de muscle (méthode dite sur explant), culture après digestion enzymatique par la collagénase (méthode qualifiée ici de mono enzymatique) et après digestion enzymatique par plusieurs enzymes (collagénase, hyaluronidase et protéase, méthode dite multienzymatique).

Différents type de produits et de milieux de culture ont été utilisés pour les trois techniques de cultures présentées ci-dessous. Leurs noms, leurs compositions et leurs abréviations sont les suivants :

Produits utilisés

1. DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM) avec Glutamax-1, sodium pyruvate, pyridoxine, 4500 mg/l glucose, GIBCOND
2. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH7,2/0,1M, GIBCOND
3. Protéase, SIGMAND
4. Collagénase (dessicat), SIGMAND
5. Hyaluronidase (dessicat lyophilisé), SIGMAND
6. Trypsine (1X), GIBCOND
7. Sérum veau fœtal (SVF), GIBCOND
8. Sérum de cheval (SC), GIBCOND
9. Extrait embryonnaire de poulet (EEP), GIBCOND
10. Diméthyl sulfoxyde (DMSO), SIGMAND
11. Pénicilline/Streptomycine (Péni/strepto), GIBCOND

Milieux préparés par l'opérateur

1. Pour les trois techniques

Milieu de culture de base : DMEM complété (DMEMc)

DMEM	79%
SVF	20%
Péni/strepto	1%

2. Pour les cultures d'explant :

Mise en culture	DMEM	89,5%
	SC	10%
	EEP	0,5%

Pour les trois techniques, une observation quotidienne a été réalisée avec un microscope à contraste de phase (NIKONND, Eclipse TE 300).

1 - Technique sur explant

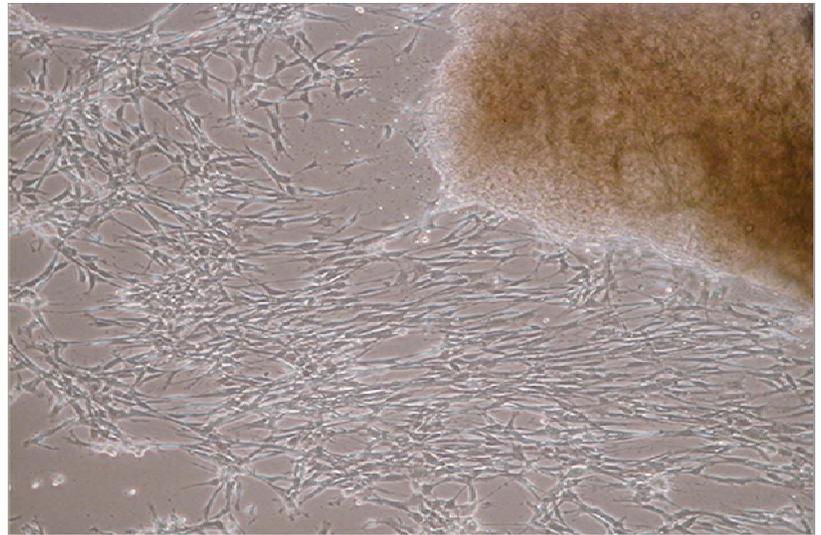
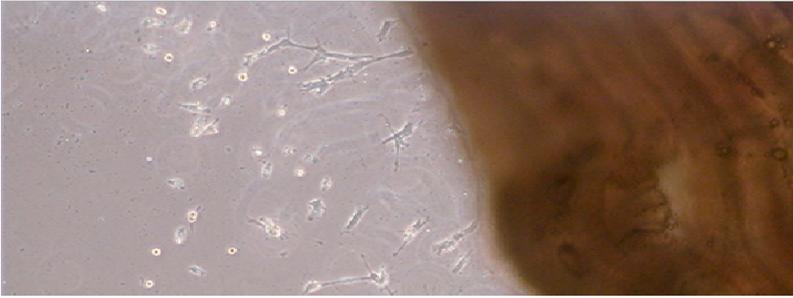
a / Préparation des explants

Chaque petit fragment de muscle (explant) a été déposé au centre d'un puits au sein d'une plaque de culture multi puits (FALCONND), 6 par boîte, et 5 boîtes en tout, donc 30 puits. Une lamelle stérile a été déposée sur chaque fragment. Une goutte de milieu préparé pour la mise en culture a alors été infiltrée par capillarité sous la lamelle. La boîte a été transférée dans une étuve humidifiée à 37°C avec 5% de CO₂. Une observation quotidienne au microscope a permis de détecter la migration de myoblastes en dehors du fragment musculaire. Deux jours après la mise en culture, 2 mL de milieu de culture classique (DMEMc) ont été placés dans les puits.

b / Passages

Lorsque la corolle cellulaire entourant l'explant a été jugée suffisamment large (voir Photo 2 et Photo 3) ou dès que les cellules commençaient à s'organiser en faisceaux (risque de formation de myotubes), les cellules ont été trypsinées pour réaliser une sous culture (passage) : après avoir retiré les lamelles, les explants ont été retirés délicatement avec une pince fine stérile. Les puits ont été nettoyés du milieu restant avec du PBS. Les cellules tapissant le fond des puits ont été détachées avec 0,5 mL de trypsine par puits. Lorsque les cellules étaient en suspension, 0,5 mL de DMEMc (riche en sérum de veau fœtal) a servi pour antagoniser la trypsine. Les suspensions cellulaires de tous les puits ont été récupérées puis l'ensemble a été redistribué dans cinq boîtes de Pétri (100 mm, FALCONND). Chaque boîte a été complétée en DMEMc pour contenir 10 mL en tout.

Un nouveau passage a été pratiqué dès que les cellules des boîtes arrivaient à plus de 70% de confluence. Un comptage a été systématiquement réalisé par comptage à la cellule de Neubauer (0,1mm/0,0025mm², POLYLABOND) avant les sous cultures. La concentration cellulaire d'ensemencement choisie était de 1.10^5 à 4.10^5 cellules/boîte de Pétri. Un changement de milieu a été effectué tous les 3 jours.



2 - Technique mono-enzymatique

Cette technique a été explorée en cours d'année et n'a donc été appliquée qu'aux trois derniers chiens opérés.

a - Préparation de la collagénase

La collagénase a été l'enzyme utilisée pour cette technique modifiée d'après Smith et al (1990). Un mélange de collagénase et de DMEM a été préparé et filtré : 0,004g par mL de DMEM, 4 à 8 mL de DMEM selon la taille du muscle. Après la phase de traitement mécanique du muscle (dilacération aux ciseaux), la moitié du produit obtenu (10 à 20 g de muscle) a été transférée à la pince dans un tube de 50 mL contenant le mélange préparé (l'autre moitié a été utilisée pour la technique multienzymatique).

b - Digestion enzymatique des fragments musculaires

Le mélange muscle/enzyme a été agité 2 heures dans un bain marie à 37°C, jusqu'à l'obtention d'un liquide à l'aspect laiteux et rosé. Deux mL de SVF et 4 mL de DMEM ont alors été ajoutés pour arrêter la digestion enzymatique. L'ensemble a été aspiré puis projeté dans le tube une vingtaine de fois avec la pipette, afin de libérer les cellules satellites situées entre les fibres musculaires. Le tube a subi une centrifugation à 200g pendant 2 min pour retirer les débris. Seul le surnageant a été gardé (cellules satellites). Il a été re-dilué dans 10mL de DMEM puis centrifugé à 200g pendant 15 min. Le surnageant a été éliminé et les cellules du culot ont été remises en suspension dans 40 mL de DMEMc divisé en 4 boîtes de Pétri (100mm).

c - Passages

Un passage a été pratiqué dès que les cellules des boîtes arrivaient à plus de 70% de confluence (voir Photo 4 et Photo 5).

Le surnageant a été enlevé des boîtes puis les cellules ont été rincées avec du PBS (10mL/boîte) pendant 1 minute. Deux mL de trypsine ont été ajoutés pendant 1 à 5 min en fonction du décollement des cellules du fond de la boîte (la boîte a été frappée avec le poing). Quatre mL de milieu complet (DMEMc) ont été ajoutés (le SVF stoppe la digestion).

Un comptage a été systématiquement réalisé par comptage à la cellule de Neubauer avant les sous cultures. Les cellules ont été transférées dans 20 boîtes de Pétri. Chaque boîte a été complétée avec 10mL de DMEMc. Les boîtes ont été mises à l'étuve humidifiée à 37°C avec 5% de CO₂ jusqu'à obtenir au moins 70% de confluence. Un changement de milieu a été effectué tous les 3 jours.

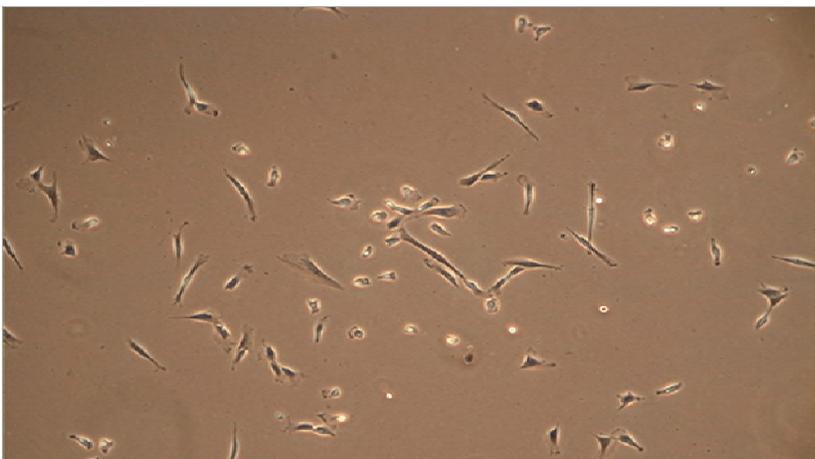
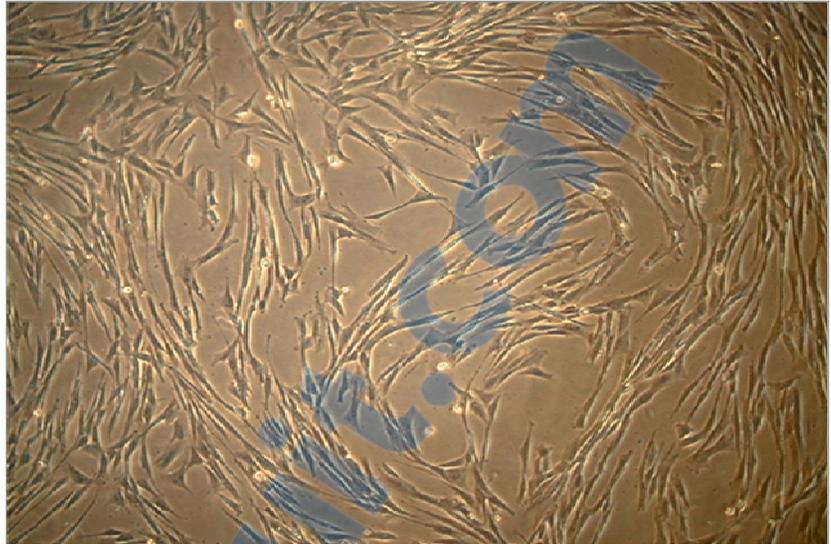


Photo 5 : Cellules satellites obtenues à J+7 par méthode mono enzymatique (x200) (cliché : N Borenstein)



3 - Technique multi-enzymatique

a - Préparation des enzymes

La collagénase, la hyaluronidase et la protéase ont été les enzymes utilisées pour cette technique modifiée d'après Chiu et al (1995). Un mélange de collagénase (0,02g), de hyaluronidase (0,004g) et de 2 mL de DMEM a été préparé et filtré. Après la phase de traitement mécanique du muscle (dilacération aux ciseaux), la moitié du produit obtenu (10 à 20 g de muscle) a été transférée à la pince dans un tube de 50 mL contenant le mélange préparé.

b - Digestion enzymatique des fragments musculaires

Le mélange muscle/collagénase/hyaluronidase a été agité 30 minutes dans un bain marie à 37°C puis centrifugé à 340g pendant 10mn ; le surnageant a été retiré. Le muscle a ensuite été recouvert par un mélange préalablement préparé et filtré de 2 mL de DMEM avec de la protéase (0,06g). Le mélange muscle/protéase a été alors agité 30 minutes dans un bain marie à 37°C.

Deux mL de SVF et 4 mL de DMEM ont alors été ajoutés pour arrêter la digestion enzymatique. L'ensemble a été aspiré puis projeté dans le tube une vingtaine de fois avec la pipette, afin de libérer les cellules satellites. Le tube a été centrifugé à 100g pendant 10 min. Seul le surnageant a été gardé (cellules satellites). Il a été re-dilué dans 10mL de DMEM puis centrifugé à 300g pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et les cellules du culot ont été remises en suspension dans 40 mL de DMEMc divisé en 2 boîtes de Pétri (100mm).

c – Passages

Les mêmes techniques ont été appliquées pour les passages, changements de milieu, comptages et traitements des cellules que pour les cellules obtenues par la technique de digestion mono enzymatique.

E - Contrôles bactériologiques et mycologiques des cultures

Deux jours avant la préparation finale des cellules pour l'implantation intramyocardique, des contrôles bactériologique et mycologique systématiques des cultures ont été entrepris.

Les milieux de cultures ont été retirés et changé dans 3 boîtes de Pétri de 100 mm; cinq mL ont été transférés dans chacun des deux flacons à hémoculture « Vital Ana 40mL bouillon » et « Vital AER 40mL bouillon ». Une lecture dans un appareil optique à hémoculture a été réalisée. Cinq mL ont également été placés dans un tube en verre pour culture mycologique sur Sabouraud.

F - Evaluation des 3 méthodes

L'objectif était de produire une quantité suffisante de myoblastes de chien à partir de cultures primaires, en peu de temps, par une méthode simple, reproductible et peu coûteuse. Plusieurs critères ont été étudiés pour comparer la validité de chaque méthode de culture cellulaire.

1 - Courbes de croissance

Des comptages systématiques des cellules à la cellule de Neubauer ont été effectués au moment de chaque passage. Les quantités de cellules ont été étudiées en fonction du temps afin de tracer des courbes de croissance et pouvoir comparer les différentes techniques entre elles pour les chiens sains et les chiens cardiopathes.

2 - Richesse en myoblastes des cultures

a - Observation de myotubes

Une boîte de Pétri (35 mm, FALCON ND) a été systématiquementensemencée au moment de chaque passage et observée au maximum de confluence pour l'éventuelle formation de myotubes, structures multi nucléées allongées et larges, précurseurs de la fibre musculaire, signant ainsi la nature myoblastique des cellules cultivées. La formation des myotubes a été favorisée par le non renouvellement du milieu de culture classique DMEMc ou l'exposition à un milieu de culture riche en sérum de cheval (10%).

b - Méthode immunocytochimique

La quantification précise de la richesse myoblastique des cultures a été pratiquée par une méthode immunocytochimique révélant la desmine (sous unité protéique des filaments intermédiaires localisés dans le cytosquelette des cellules musculaires).

Les cellules d'une boîte de Pétri de 35 mm ont été rincées avec du PBS avant d'être fixées à -18°C dans du méthanol (100%) pendant 5 min.

Le mélange a alors été enlevé et les cellules ont séché. Puis les cellules ont été rapidement réhydratées avec du PBS avant d'être recouvertes d'un mélange PBS/ SVF 2% pendant 30 min. Après trois rinçages avec du PBS, le premier anticorps monoclonal anti-desmine (isotype de souris IgG1, SIGMAND) 1:100 dilué dans du PBS/SVF 1% a été déposé sur les cellules pendant une heure. Après 4 rinçage avec du PBS/SVF 0,01%, le deuxième anticorps Cy3 (FluorolinkND CyND 3 IgG, Amersham Pharmacia BiothechND) 1:200 dilué dans du PBS/SVF 1% a été déposé au contact des cellules pendant 30mn. Puis les cellules ont été rincées 4 fois avec du PBS / SVF 0,01% avant d'être recouvertes par des lamelles avec un mélange Glycérol/PBS (50%). Les lamelles ont enfin été fixées avec du vernis à ongle. Pour chaque boîte traitée par immunocytochimie, une boîte contrôle a été constituée où seul le deuxième anticorps Cy3 a été déposé au contact des cellules.

L'observation a été réalisée avec un microscope à immunofluorescence (NIKONND, Eclipse TE 300).

Cette quantification n'a été pratiquée que sur les cultures issues des chiens atteints de CMD et lorsque chaque type de culture avaient produit au moins 5×10^7 cellules en tout. Le pourcentage de myoblastes a été déterminé par le calcul suivant :

Nombre de cellules fluorescentes/nombre de cellules totales (moyenne pour trois champs microscopiques x 100 pris au hasard).

En plus des facteurs quantifiables exposés, le temps, la complexité et la reproductibilité des manipulations ont été notées.

G - Congélation et décongélation des myoblastes

Une fois le nombre de cellules nécessaires atteint pour la transplantation intramyocardique, les cellules ont été congelées pour des raisons d'économie et d'organisation de la procédure.

Cette congélation s'est toujours faite dans des cryotubes stériles de 1 mL (NALGENEND) contenant le milieu de congélation ci-dessous, à une concentration variant de 1 à 5 x 10⁶ cellules par mL :

Milieu de congélation =	70%	DMEM pur
	20%	SVF
	10%	DMSO

La congélation a été faite en transférant très rapidement les cryotubes à - 80°C. Les cellules y sont restées jusqu'au jours de la greffe ou jusqu'à ce qu'elles soient employées au cours d'une autre manipulation (de quelques jours à plusieurs mois).

La décongélation a été réalisée en transférant les cryotubes dans une étuve à 37°C. Il ont été ensuite rapidement centrifugé à 300g pendant 1 min ; le surnageant a été retiré et les cellules ont été remises en suspension dans du DMEM pour être centrifugées à nouveau (lavage des cellules). Les cellules ont été enfin remises en suspension dans le milieu ad hoc : DMEMc pour une culture ou sérum autologue du chien pour la transplantation intramyocardique.

La mortalité cellulaire jugée au bleu trypan 0,4% (GIBCOND) pendant cette phase de congélation-décongélation se situait autour de 5%. Quatre régimes de congélation progressive différents ont donc été évalués pour améliorer la survie cellulaire lors de cette phase délicate :

1. Cellules à 4°C pendant 2h puis à -18°C pendant 2h puis à -80°C pendant 48h
2. Cellules à -18°C pendant 2h puis à -80°C pendant 48h
3. Cellules directement à -80°C pendant 48h avec une protection (carton)
4. Cellules directement à -80°C pendant 48h sans protection

H - Transport des myoblastes

Les cellules ont été cultivées et préparées à l'hôpital Broussais ; la greffe a eu lieu dans une institution différente située à 30 min de voiture (Ecole Vétérinaire d'Alfort). Il était donc nécessaire de mettre au point le meilleur milieu et les meilleures conditions de transport des cellules, pour assurer une survie cellulaire optimale pendant cette période.

Les cellules ont été transportées dans deux cryotubes de 1 mL placés dans un flacon, à la concentration de 2,5x10⁷ cellules par mL (5x10⁷ cellules en tout), dans une boîte de polystyrène. La température interne était de 5 à 8°C, maintenue par des glaçons dans des gants de latex, isolés du flacon contenant les cellules par du papier. Le milieu de transport était constitué de 100% du sérum du chien greffé, préalablement prélevé et préparé lors de la première intervention (biopsie). Le temps maximal de transport entre le conditionnement des cellules et leur implantation était de 1 heure.

Pour déterminer ces conditions de transport et de conditionnement, une série d'expériences préliminaires ont été nécessaires. Dans chacune de ces expériences, un des paramètres cités variait : température, temps de latence avant implantation et concentration en sérum autologue par rapport au

milieu de culture DMEM. La mortalité cellulaire était évaluée au bleu trypan 0,4% pour chacune des phases de chacune de ces expériences.

II – RESULTATS

A - Analyse histologique des muscles prélevés

Les muscles squelettiques prélevés sur les quatre chiens atteints de CMD n'ont montré aucune anomalie, tant en microscopie optique classique qu'en microscopie électronique (voir Photo 6 et Photo 7).

Photo 6 : L'analyse histologique du muscle sartorius par microscopie optique n'a montré aucune anomalie sur les quatre chiens opérés
(Coloration HEA, x100 ; cliché : Pr Bruneval)

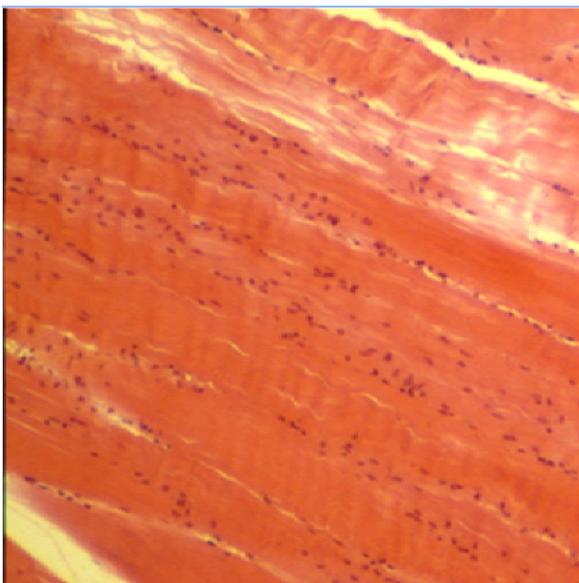
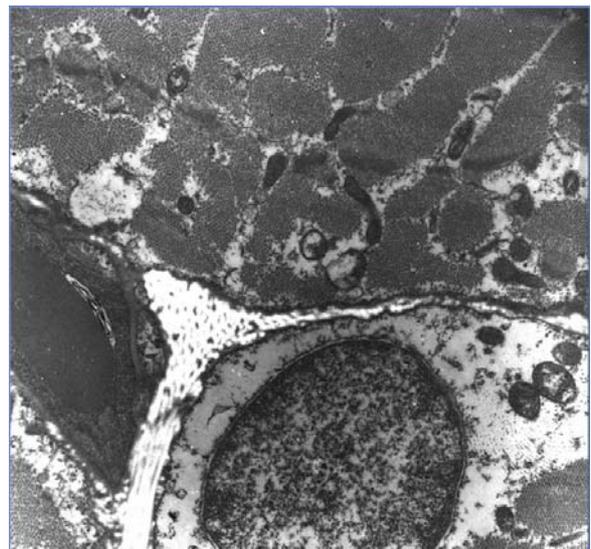


Photo 7 : L'analyse histologique du muscle sartorius par microscopie électronique n'a montré aucune anomalie sur les quatre chiens opérés
(x20000 ; cliché : Pr Bruneval)



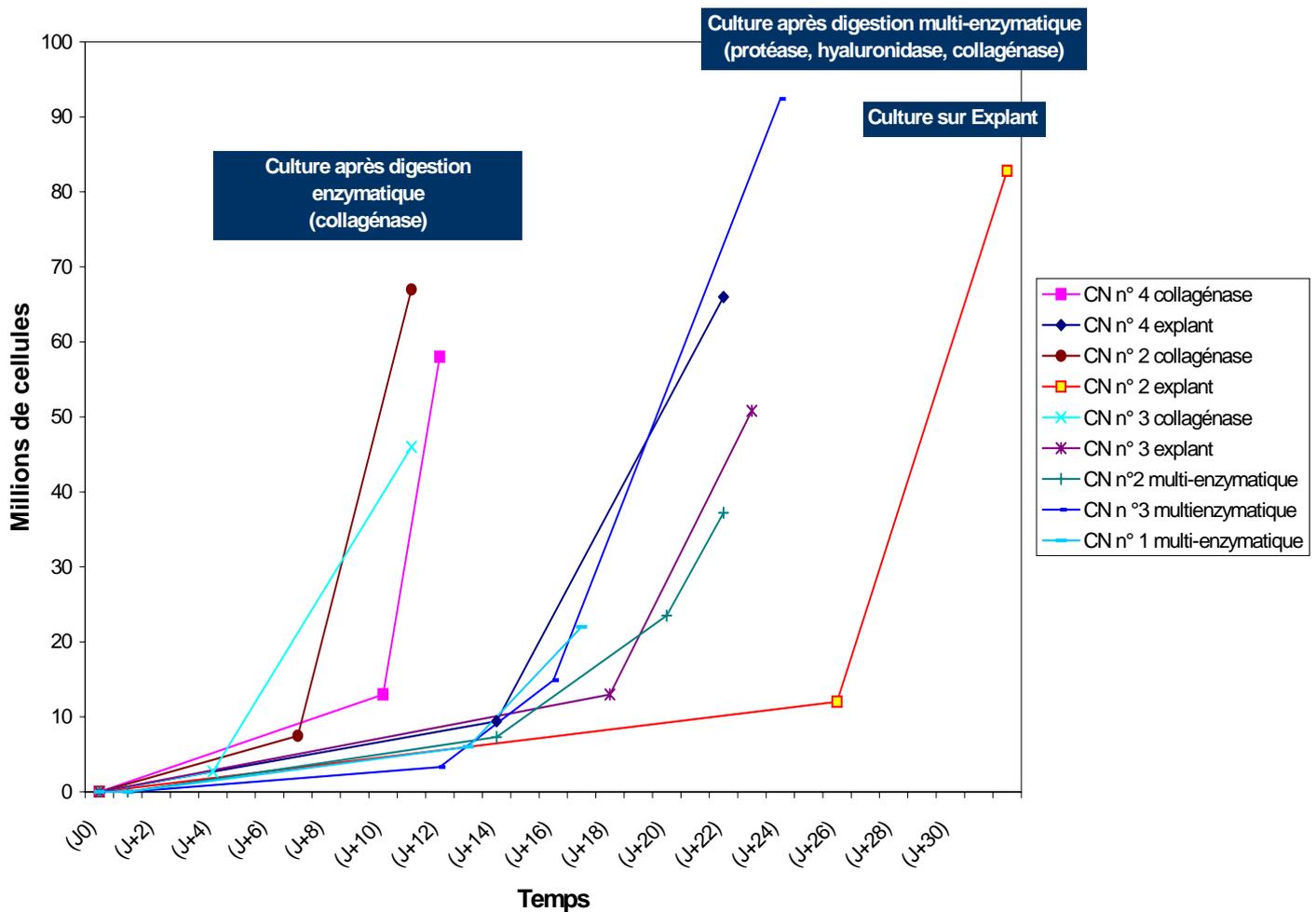
B - Evaluation des 3 méthodes

1 - Courbes de croissance

Le nombre de cellules n'a pas pu être déterminée pour la première sous culture par la technique sur explant à cause de la trop faible concentration cellulaire de départ. De même, pour la toute première mise en culture des techniques par digestion enzymatique, la richesse en débris musculaires n'a pas permis d'évaluer le nombre de cellules contenues dans ces préparations.

La Figure 4 donne les courbes de croissance pour les trois techniques utilisées et ce pour les quatre chiens opérés. Les méthodes multi enzymatique et sur explant ont permis d'obtenir 50 millions de cellules en environ 3 à 5 semaines. La technique mono enzymatique a permis d'obtenir cette même quantité en 12 à 14 jours. Quatre à cinq passages ont été nécessaires pour les deux premières techniques contre 2 pour la méthode mono enzymatique. Il est à noter qu'après 4 ou 5 passages, les cultures prolifèrent souvent moins et les cellules prennent un aspect plus étalé.

Figure 4 : Courbe de croissance cellulaire en fonction des différentes techniques utilisées



2 - Richesse en myoblastes des cultures

a - Observation de myotubes

Des myotubes ont été observés dans toutes les boîtes de Pétri d'observation (35 mm), signant ainsi la nature myoblastique d'au moins une partie des cellules cultivées, et ce pour les trois techniques employées. Le reste des cellules est considérée comme de nature fibroblastique. C'est dans les cultures obtenues par digestion mono enzymatique que le plus de myotubes ont été observés (jusqu'à recouvrir l'essentiel de la boîte de Pétri) (voir Photo 10 et Photo 11).

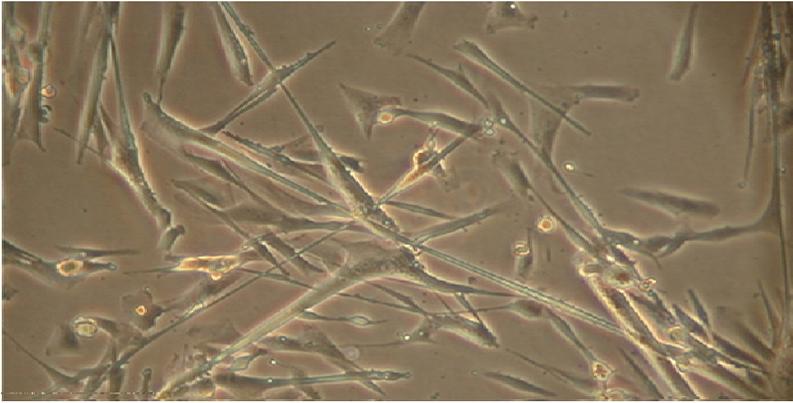
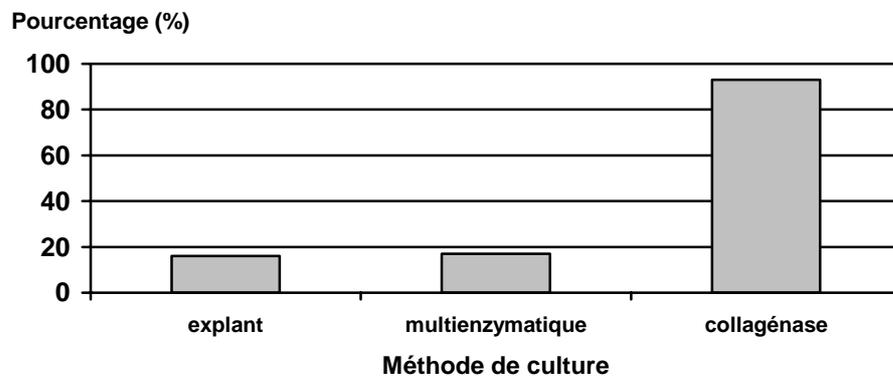


Figure 5 : Pourcentage de myoblastes dans les cultures (déterminés par méthode immunocytochimique révélant la desmine)



La méthode mono enzymatique à la collagénase a permis d'obtenir systématiquement plus de 93% de myoblastes (Photo 10 et Photo 11). Les deux autres méthodes utilisées n'aboutissent qu'à des pourcentages variables et très inférieurs (5 à 25% en moyenne).

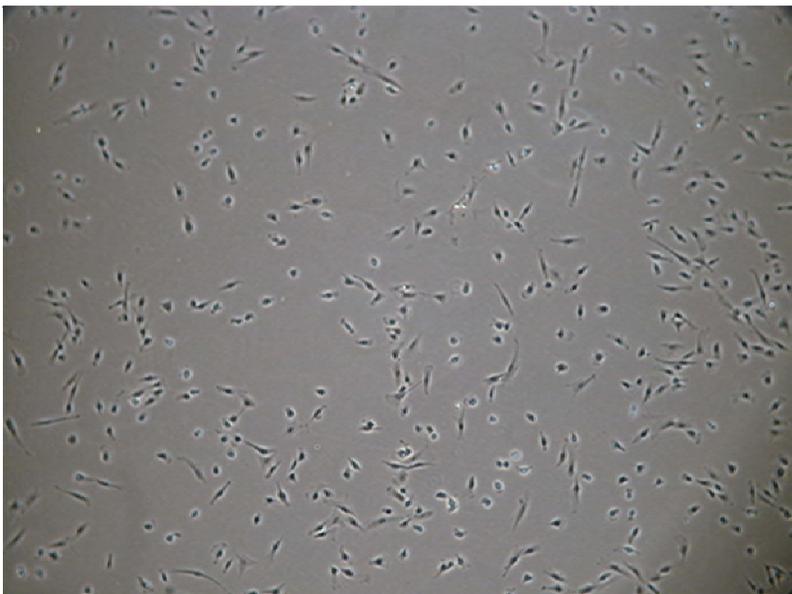
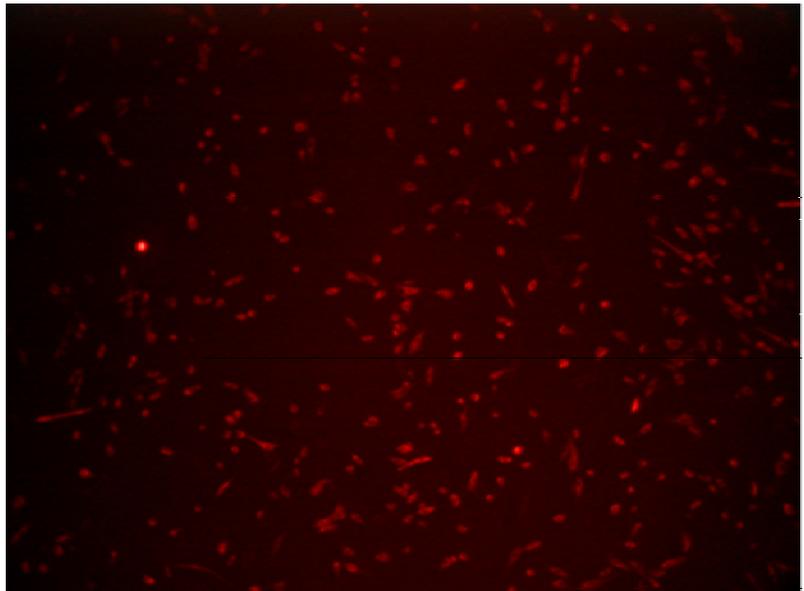


Photo 10 : Cellules satellites obtenues à J+14 et deux passages (x200)
(cliché : N Borenstein)

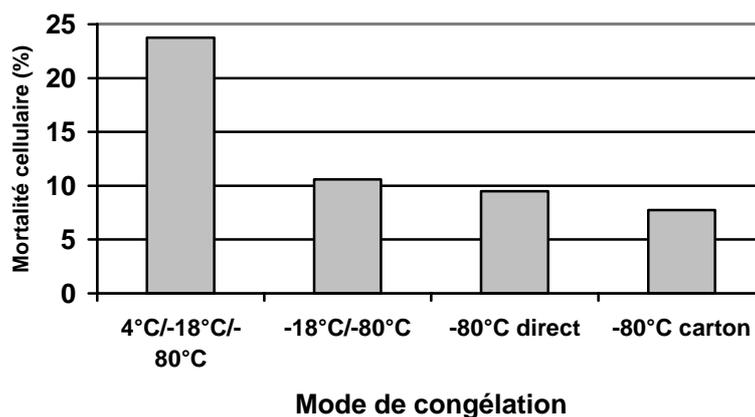
Photo 11 : Méthode immunocytochimique révélant la desmine, pratiquée sur les les cellules de la photo 10 : plus de 90% de ces cellules expriment de la desmine et sont donc des myoblastes (x200) (cliché : N Borenstein)



C - Congélation et décongélation des myoblastes

La Figure 6 expose les résultats obtenus pour les 4 modes de congélation comparés. Le plus faible taux de mortalité cellulaire a ainsi été obtenu en transférant rapidement les cryotubes dans le congélateur à -80°C , emballées dans du papier à l'intérieur d'un carton.

Figure 6 : Mortalité cellulaire selon différents modes de congélation

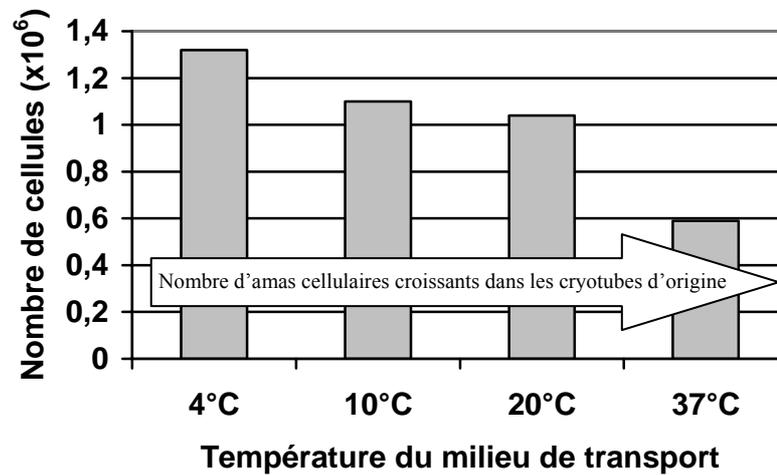


D - Transport des myoblastes

La Figure 7 montre que la mortalité cellulaire ne varie pas en fonction de la température du milieu de transport ; en revanche, le nombre d'amas cellulaires (agrégats de plusieurs dizaines à centaines de cellules), dont beaucoup restent accrochés au fond du cryotube, croît avec une

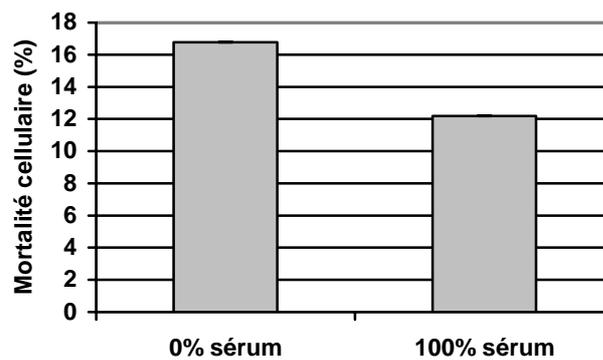
température croissante du milieu de transport, rendant ainsi la procédure beaucoup plus aléatoire quant au nombre de cellules greffées et à leur éventuelles répartition dans la paroi myocardique.

Figure 7 : Nombre de cellules obtenues par boîte de Pétri après 5 jours de culture, en fonction de la température du milieu de transport



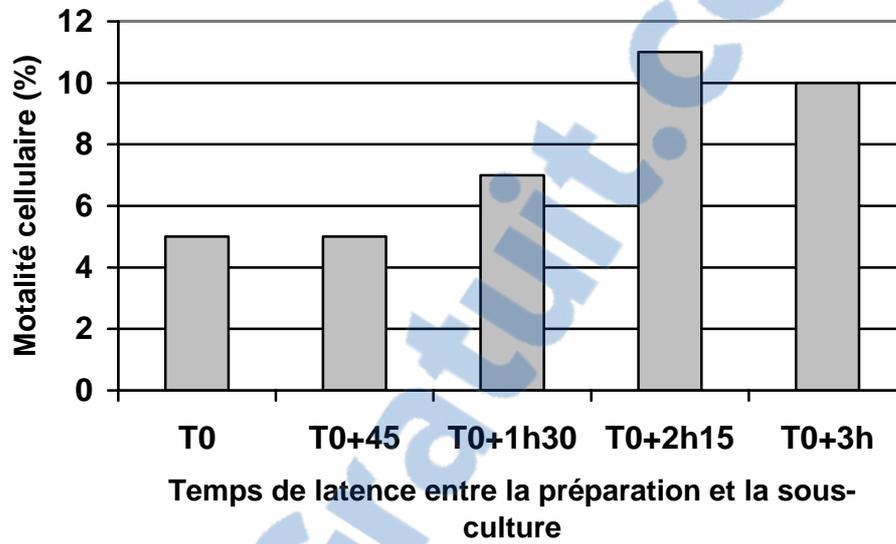
La Figure 8 montre également que le sérum autologue du chien assure une meilleure survie aux cellules contenues dans le cryotube.

Figure 8 : Mortalité cellulaire en fonction du milieu de transport 2 heures après préparation



La Figure 9 quant à elle, illustre l'augmentation nette de la mortalité cellulaire une heure après le conditionnement.

Figure 9 : Mortalité cellulaire pendant le transport en fonction du temps de latence avant la greffe



TRANSPLANTATION CELLULAIRE INTRAMYOCARDIQUE CHEZ DES CHIENS ATTEINTS DE CARDIOMYOPATHIE DILATEE

I - MATERIEL ET METHODES

A - Recrutement et critères d'inclusion

Quatre chiens ont été inclus dans le protocole de cardiomyoplastie cellulaire. Ces chiens ont été référés aux cliniciens de l'Unité de Cardiologie de l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort par d'autres cliniciens de l'Ecole ou par des confrères des cliniques vétérinaires de la région parisienne.

Les propriétaires ont tous signé une feuille d'engagement moral où ils reconnaissent avoir été pleinement informés de la gravité de la maladie de leur animal, de la nature du protocole proposé, de ses bénéfices et risques éventuels pour le chien et de ses retombées potentielles en terme de santé humaine (voir Annexe : Protocole chirurgical – Cardiomyopathie dilatée, Accord et responsabilités des propriétaires et Figure 21).

La suspicion clinique a reposé sur des critères cliniques (abattement, intolérance à l'effort, polypnée, ascite, souffle cardiaque éventuel, troubles du rythme, etc.) ainsi qu'épidémiologique (chien de grande race). Le diagnostic a été confirmé par électrocardiogramme, radiographie du thorax et échocardiographie. Les critères échocardiographiques d'inclusion étaient la présence d'une fraction de raccourcissement du ventricule gauche (définie comme la différence des diamètres télédiastoliques et télésystoliques sur le diamètre télédiastolique) inférieure à 29% [norme : 29%-45%], en dehors de toute autre anomalie expliquant cette chute de l'inotropisme.

Les chiens ont été stabilisés médicalement pendant le nombre de semaines nécessaires avant la première intervention (biopsie du muscle sartorius). Les médicaments utilisés incluaient des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), des diurétiques et des digitaliques.

B - Anesthésie

1 - Prémédication

Trente minutes avant l'induction, les chiens ont reçu une prémédication avec du sufentanil (SUFENTAND, 5ug/kg IM). Une pré oxygénation a été réalisée avec un masque placé devant les narines des animaux, délivrant 100 ml/kg d'oxygène.

2 - Induction

L'induction a été réalisée à l'aide de midazolam (HYPNOVELND, 0.2 mg/kg IV) suivi d'étomidate (HYPNOMIDATEND, 1 mg/kg IV) ; les animaux ont ensuite été intubés et placés sous oxygène pur.

Les chiens sont restés environ 30 minutes en salle d'induction pour la préparation chirurgicale du thorax ainsi que la mise en place d'une voie veineuse centrale sur la veine jugulaire droite (mesure de la pression veineuse centrale) et d'un cathéter artériel sur l'artère métatarsienne dorsale du postérieur droit (pression artérielle invasive).

3 - Entretien

Les animaux ont été placés sous ventilation contrôlée (volume courant : 15 ml/kg/min, permettant d'atteindre une pression de 15 mm H₂O).

Un protocole d'anesthésie balancée (dite multi nodale) a été mis en route par l'administration continue au pousse seringue d'un opioïde (sufentanil, 0.1 µg/kg/min IV), et l'injection à la demande (environ toutes les 20-30 min) d'une benzodiazépine (midazolam, 0.2 mg/kg IV). Un curare non – dépolarisant (vécuronium, 0.1 mg/kg IV) a été administré avant la sternotomie (une seule fois). Les vitesses d'administration et les réinjections ont été modulées en fonction des réponses des animaux.

Afin d'éviter la survenue de troubles du rythme et en particulier d'extrasystoles ventriculaires lors du geste chirurgical sur le cœur, les chiens ont également été perfusés en continu avec de la lidocaïne (XYLOCAINEND, 50µg/kg/min, IV)

Le circuit anesthésique était de type recirculant. Pendant toute la durée de l'intervention, les animaux ont été perfusés avec un soluté de Ringer Lactate (10 ml/kg/h). Ils ont reçu une injection de céfalexine (RILEXINEND, 30 mg/kg, IV) au moment de l'induction puis toutes les 2 heures pendant l'intervention. Ils ont également été placés sur tapis chauffant à circulation d'eau.

La surveillance comportait un stéthoscope oesophagien, un ECG (surveillance de D2 et de deux dérivations précordiales) et les mesures suivantes : pression artérielle invasive, pression veineuse centrale, capnométrie, température corporelle (sonde oesophagienne). Une sonde urinaire a également été mise en place pour la mesure du débit urinaire pendant l'intervention.

Des valeurs seuil étaient fixées : fréquence cardiaque entre 60 et 120 bpm , pression artérielle moyenne entre 60 et 90 mm Hg, pression veineuse centrale entre 0 et 10 cm d'eau, pression partielle en CO₂ entre 35 et 45 mm Hg.

De la dobutamine (DOBUTREXND) à une dose de 2 à 10 g/kg/min IV a été utilisée. Les vitesses d'administration ont été adaptées aux réponses de l'animal.

La perfusion de lidocaïne a été poursuivie une heure après la fin de l'anesthésie. Au moment de la fermeture du thorax par le chirurgien, un bloc de bupivacaïne 0.5 % a également été réalisé sur les espaces intercostaux intéressés par la thoracotomie (1 ml à chaque injection, trois sites intercostaux en tout).

C - Technique chirurgicale

1 - Voie d'abord

Une tonte large de toute la face latérale du thorax a été effectuée. L'animal était placé en décubitus latéral droit. Un billot a été placé sous le thorax. L'abord chirurgical s'est fait par thoracotomie intercostale gauche par le 4^{ème} espace intercostal. Les muscles cutanés du tronc, grand dorsal, dentelé, scalènes et intercostaux ont été incisés dans le sens des côtes. Une fois la cavité pleurale pénétrée, un écarteur auto statique de Finochietto a été introduit dans le 4^{ème} espace intercostal. Le péricarde a été ouvert sur toute sa longueur, le long du grand axe cardiaque et mis en tension par des fils de tractions reliés au champ opératoire.

2 - Préparation des cellules pour l'implantation intramyocardique

Les cellules ont été transportées dans deux cryotubes de 1 ml placés dans un flacon, à la concentration de $2.5 \cdot 10^7$ cellules par ml ($5 \cdot 10^7$ cellules en tout), dans une boîte de polystyrène. La température interne était de 5 à 8°C, maintenue par des glaçons dans des gants de latex, isolés du flacon contenant les cellules par du papier. Le milieu de transport était constitué à 100 % du sérum du chien greffé, préalablement prélevé et préparé lors de la première intervention (biopsie). Le temps maximal de transport entre le conditionnement des cellules et leur implantation était de 1 heure. Une homogénéisation des contenus des cryotubes a été pratiquée avant l'implantation cellulaire (voir Photo 12).

Photo 12 : Deux cryotubes contenant $2,5 \cdot 10^7$ cellules/mL (cliché : N Borenstein)



3 - Préparation de la seringue de Hamilton

Une seringue de Hamilton de 100 μ l avec une aiguille de 25 G a été préalablement préparée et stérilisée avec de l'aldylhène, puis rincée avec du sérum physiologique avant utilisation. Un cône a été taillé à façon pour servir de garde et ne laisser dépasser qu'une petite partie de l'aiguille ; ce dispositif simple a assuré ainsi une injection intramyocardique. Les longueurs d'aiguille ont été sélectionnées en fonction de l'épaisseur myocardique, déterminée par l'échocardiographie préopératoire. Une longueur de 5 mm à 8 mm pour le ventricule gauche et de 4 mm à 5 mm pour le ventricule droit a été choisie (voir Photo 13).

Photo 13 : Seringue de Hamilton préparée : un cône taillé à façon sert de garde pour ne laisser dépasser que 5 à 8 mm d'aiguille.

Ce procédé assure une injection intramyocardique (cliché : N Borenstein).



4 - Injections intramyocardiques

Chaque injection contenait $2.5 \cdot 10^6$ cellules, délivrées dans 100 μ l (voir Photo 14 et Photo 15). Vingt injections ont été pratiquées en tout : 10 sur le ventricule gauche et 10 sur le ventricule droit si l'insuffisance cardiaque était biventriculaire (chiens n° 1 et 3) ou 15 sur le ventricule gauche et 5 sur le ventricule droit si l'insuffisance cardiaque n'atteignait principalement que le cœur gauche (chiens n° 2 et 4).

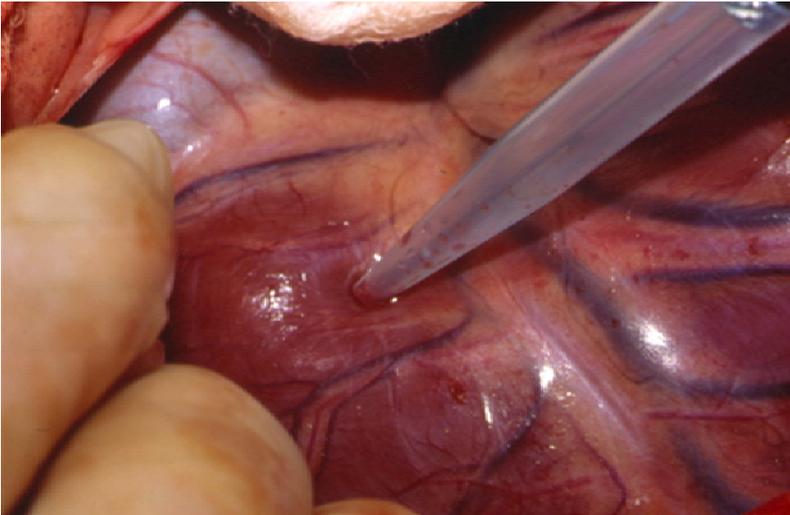
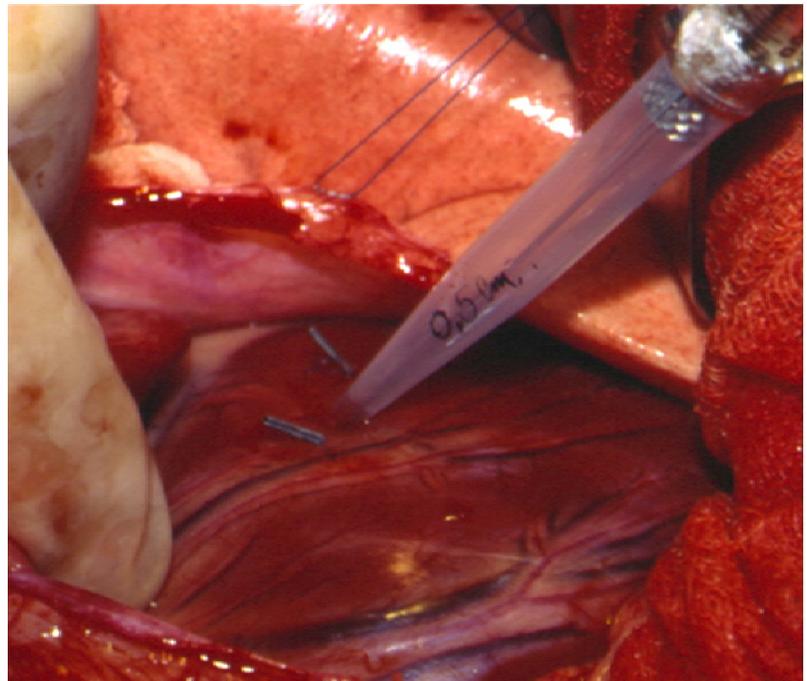


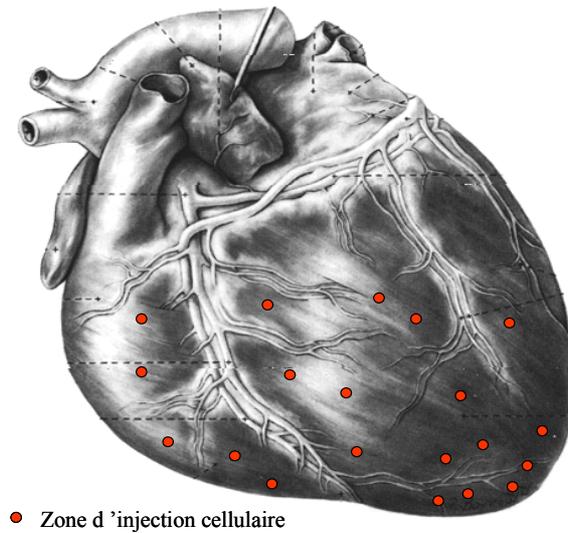
Photo 14 : Injection réalisée sur le ventricule droit, à droite de l'artère et de la veine interventriculaire antérieures (cliché : N Borenstein)

Photo 15 : Injection intramyocardique contenant $2,5 \cdot 10^6$ cellules. L'injection est réalisée sur le ventricule gauche entre deux point de suture épicaudique (cliché : N Borenstein)



La localisation des injections s'est faite en fonction de la topographie coronaire (de part et d'autre et entre chaque branche collatérale de l'artère interventriculaire antérieure). Le reste des ventricules gauche et droit ont été greffés avec le nombre restant d'injections. Pour le chien n° 2, dont la scintigraphie myocardique démontrait une zone d'hypoperfusion apicale gauche, cette zone a été plus particulièrement greffée (7 injections en tout) (voir Figure 9). Ces injections ont été notées sur une feuille et photographiées. Deux zones d'injections ont été repérées par un point de suture épicaudique avec un fil de polypropylène 6-0 (PolèneND) pour faciliter les prélèvements prévus le jour d'une éventuelle autopsie.

Figure 10 : Zones d'implantation dans les ventricules droit et gauche



La zone ventriculaire gauche et droite de la face latérale droite du cœur (correspondant à un peu moins de la moitié de la circonférence) n'a délibérément pas été greffée. Cette zone a servi de zone contrôle pour les analyses anatomo-pathologiques et pour l'échographie Doppler tissulaire (DTI).

Un contrôle de l'ECG était effectué au moment de chaque pénétration de l'aiguille et pendant les injections.

5 - Fermeture du thorax

Le péricarde a été refermé presque en totalité par un surjet continu avec du fil de polydioxanone (PDS IIND). Après la mise en place d'un drain thoracique à aspiration continue, la paroi costale a été fermée de manière classique plan par plan. Du fil de polyglatine 910 (VICRYLND) décimale 4 a été utilisé pour rapprocher les côtes et suturer les différents plans musculaires par des surjets interrompus ; ce même fil en décimale 3 a été utilisé pour le surjet sous-cutané ; puis un surjet continu avec un fil de polyamide (ETHILONND) décimale 2 a été réalisé sur le plan cutané.

D - Soins post-opératoires

Les chiens ont passés 24 heures minimum en soins intensifs après l'intervention, avant d'être transférés au chenil d'hospitalisation.

Les traitements préexistants pour l'insuffisance cardiaque ont été continués (furosémide – LASILIXND, bénazépril – CIBACENEND, digoxine – DIGOXINE NATIVELLEND).

Les cathéters veineux central et artériel ont été retirés avant le réveil du chien.

De la morphine (MORPHINE BASEND) a été administré au moment du réveil de l'animal (0.2 mg/kg IV) et a été, par la suite, injectée toutes les 8 heures, pendant 48 heures. Une injection de kétoprofène (KETOFENND), à la dose de 2 mg/kg IM, a également été faite pendant le réveil de l'animal.

De la dobutamine à une dose de 2 à 5 g/kg/min IV a été administrée pendant les 24 heures post-opératoires. L'arrêt s'est fait par diminution progressive de cette dose.

Chez le chien n°4, une injection d'héparine (HEPARINE CHOAYND) (0.5 mg/kg SC) a été débutée dès que le drain ne produisait plus de liquide hémorragique et a été continuée pendant 48 heures à cette même dose et trois fois par jour.

Selon l'état clinique du chien en post-opératoire, une administration continue d'oxygène par canule intra-nasale a été effectuée pendant 1 à 5 jours.

Le drain a été retiré après 48 h ou dès qu'il ne produisait plus. Un cliché radiographique du thorax a été effectué sur tous les chiens au moment du retrait du drain.

Une surveillance ECG par holter a été laissée en place pendant toute la phase post-opératoire. Un contrôle de la pression artérielle non invasive avec un système oscillométrique (DYNAMAPND) a également été pratiqué une à trois fois par jour selon l'état clinique de l'animal.

Une surveillance quotidienne de l'hématocrite et des protéines totales a été observée. Un bilan hémato biochimique complet comprenant la troponine a été pratiquée 48 heures après la fin de l'intervention.

E - Evaluation clinique des animaux en pré- et post-greffe

L'évaluation clinique a été fondée sur la classification de la New York Heart Association (NYHA) :

Classe I : pas de signe d'intolérance à l'effort

Classe II : dyspnée après un effort intense

Classe III : dyspnée après un effort modéré

Classe IV : dyspnée permanente

F - Evaluation hémodynamique et de la viabilité myocardique

1 - Echographie Doppler classique

Un échographe couleur Doppler pulsé AU3 Partner Esaote BiomedicaND, avec une sonde bifréquence de 7,5/5 3,5/2,5 MHz a été utilisé pour l'analyse de la fonction cardiaque. Cette analyse a été pratiquée par des coupes « petit axe » et « grand axe » para-sternales droite et gauche en mode bidimensionnel (2D), temps-mouvement (TM), Doppler pulsé et Doppler couleur. Les mesures de la fraction de raccourcissement et de la fraction d'éjection ont été pratiquées grâce à une coupe transventriculire, permettant un axe de tir entre les deux piliers du ventricule gauche pour la mesure en mode TM. Le mode 2D a permis une estimation de la contractilité, d'éventuelles anomalies intra-pariétales et a permis l'orientation pour les mesures en modes TM et Doppler.

L'échographie de départ (première consultation) incluait de nombreux paramètres afin de déterminer le degré d'atteinte gauche et droite, ainsi que la dilatation des quatre cavités (voir Tableau IX). Les paramètres de suivi sélectionnés au cours de l'étude (en pré- et post-opératoire) ont été les suivants :

Tableau IV : Paramètres de suivi par échocardiographie avant et après la greffe

Vol Syst Ind ml/m2	Volume systolique indexé à la surface corporelle
PPVGs mm	Paroi postérieure su ventricule gauche en systole
FE %	Fraction d'éjection
FR %	Fraction de raccourcissement
PP %	Pourcentage d'épaississement de la paroi postérieure du ventricule gauche
EAAO mm	Excursion aortique antérieure
ES mm	Distance point E (excursion protodiastolique du feuillet mitral) / point S (septum)

Lors de chaque visite pour une échographie, un électrocardiogramme (avec un appareil Delta 3 plus CARDIOLINEND) et une mesure non invasive de la pression artérielle par un système oscillométrique (DYNAMAPND) ont été pratiqués. Un cliché radiographique du thorax a également été réalisé lors de la première visite.

Les chiens ont été échographiés le jour des interventions chirurgicales (biopsie et greffe), puis à 15 jours, 3 semaines, 1 mois, 2 mois, puis 3 mois après la greffe. Les chiens n°1 et 3 sont morts respectivement 10 et 5 jours après la greffe et n'ont donc pas eu d'échographie post-opératoire.

2 - Echographie doppler tissulaire (Doppler Tissue Imaging – DTI)

Un échographe Doppler tissulaire ACUSSONND, avec une sonde de 3,5/5 MHz, a été utilisé pour l'analyse de la contractilité segmentaire intra-pariétale sur les chiens n°2 et 4 en post-opératoire (respectivement 3 semaines et 3 mois après la greffe). Pour acquérir des images de références en DTI sur un chien non greffé, un Doberman femelle de 8 ans, candidat potentiel dont le propriétaire a refusé toute participation au protocole de cardiomyoplastie cellulaire, a également été échographié. Ce chien était atteint d'une insuffisance cardiaque gauche et droite évoluée (classe NYHA III), avec une fraction de raccourcissement de 6%, une dilatation biventriculaire majeure et un amincissement pariétal notable.

Ces images ont également été comparées aux résultats obtenus sur une série de chiens sains préalablement étudiée, pour une expérimentation sans rapport avec notre travail (Derumeaux, résultats non publiés).

Le réglage à la réception de l'échelle des gris a été ajusté au minimum, afin de conserver une image interprétable des contours myocardiques et d'obtenir une meilleure différenciation de l'endocarde et de l'épicarde.

Les images en mode TM ont été acquises en temps réel au cours de l'examen, par une carte d'acquisition numérique, et stockées dans un fichier permettant une exploitation directe des données du codage Doppler tissulaire myocardique.

Un logiciel de quantification a permis la quantification des vitesses par la traduction chiffrée des couleurs en vitesses en référence à une échelle colorimétrique figurant sur l'écran de l'échographe.

Une cartographie des vitesses moyennes a été établie dans l'endocarde et dans l'épicarde en systole. Le gradient de vitesse entre endocarde et épicarde a été calculé par la différence des vitesses moyennes de chaque région de la paroi myocardique.

3 - Scintigraphie cardiaque au Thallium

Cet examen a été réalisé sur le chien n° 4 trois jours avant et trois semaines après la greffe intramyocardique.

La topographie en simple photon (SPECT : pour Single Photon Emission Computed Tomography) a été acquise au repos par une gamma caméra simple tête Apex (Elsint), 10 minutes après l'injection de 110 MBq de Thallium 201. L'animal était placé en décubitus latéral droit, avec une rotation elliptique du détecteur sur 180° (du profil droit – 90° au profil gauche +90° en 30 pas de 6° acquis en 50 secondes pour une durée totale de 25 min). Les collimateurs étaient en basse énergie,

tout usage. Les pics d'énergie étaient centrés à 70 keV et 167 keV avec une fenêtre de +/- 10%. Matrice : 64 x 64, zoom 1,5, taille du voxel : 6,83 mm³.

Pour réaliser cet examen, l'animal a été anesthésié de la même façon que pour les interventions chirurgicales ; le protocole est décrit dans la partie « B – Anesthésie » de ce chapitre.

La reconstruction tomographique a été réalisée par rétroprojection filtrée (Butterworth) sans correction d'atténuation et visualisée selon les trois axes cardiaques : grand axe sagittal (2 cavités), transverses (4 cavités) et petit axe. La fixation du traceur a été analysée avec un logiciel spécifique écrit pour le laboratoire : segmentation du bull's eye en 13 régions et 4 grades par rapport au point de fixation maximale (= 100%) :

Grade 4 : fixation normale (entre 70 et 100% du point de fixation maximale)

Grade 3 : hypofixation modérée (entre 50 et 70%)

Grade 2 : hypofixation sévère (entre 30 et 50%)

Grade 1 : nécrose probable (inférieur à 30% du maximum).

G - Prélèvements sanguins

Les chiens inclus dans le protocole ont régulièrement eu des prélèvements sanguins pour numération et formule sanguine ainsi que bilan biochimique complet dont créatinine phosphokinase (CPK) et troponine, à 24 h avant et 48 h après la greffe, afin d'évaluer le retentissement myocardique de l'implantation.

H - Autopsie et analyse histologique

Tout animal décédé au cours du protocole a été autopsié. Le cœur a été prélevé en différents endroits : zones greffées et zones non greffées des ventricules gauche et droit respectivement. Chaque prélèvement a été divisé en deux éléments. Le premier a été fixé dans du formol dilué au 1/10^{ème} pour la microscopie optique, le deuxième a été fixé dans du glutaraldéhyde 2,5% pour la microscopie électronique. Les poumons ont également été prélevés. Les techniques utilisées pour le conditionnement et la préparation des prélèvements sont les mêmes que celles précédemment décrites

Sur les coupes en paraffine pour la microscopie optique, une révélation par une technique immunohistochimique de la desmine et de l'actine a été appliquée pour différencier les fibroblastes des myoblastes dans plusieurs plages. Pour cette technique, après une inclusion en paraffine classique, les coupes ont été déparaffinées et réhydratées avec du PBS puis incubées 30 min avec les anticorps primaires suivants : anti-human desmin au 1 : 100^{ème} (DAKOND) et anti-human actin au 1 : 50^{ème} (isoformes alpha et gamma, DAKOND). Après un rinçage dans du PBS, les coupes ont été incubées pendant 30 min avec un anticorps anti-IgG de souris biotinylé au 1 : 400^{ème} (AMERSHAMND). Après un rinçage dans du PBS, les coupes ont été incubées pendant 30 min avec

de la streptavidine couplée à de la peroxydase. Après un rinçage dans du PBS, les coupes ont été incubés pendant 30 min avec les substrats de la peroxydase (eau oxygénée et diamino-benzidine) jusqu'à obtention d'un produit de réaction coloré en marron. Puis, elles ont enfin été rincées et déshydratées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes dans du toluène.

II - RESULTATS

A - Etat pré-opératoire des chiens

Le tableau V et le Tableau VI donnent un aperçu de l'état pré opératoire des chiens inclus dans le protocole. La Photo 16 présente trois des quatre animaux opérés.

Tableau V : Série des chiens inclus dans le protocole

CHIEN	CHIEN n°1	CHIEN n°2	CHIEN n°3	CHIEN n°4
Race	Berger allemand	Bobtail	Terre neuve	Danois
Age	13 ans	10 ans	9 ans	8 ans
Sexe	mâle	mâle	femelle	Mâle
Poids	40 kgs	35 kgs	38 kgs	65 kgs
Statut médical	CMD très évoluée	CMD débutante	CMD évoluée	CMD débutante
Classe NYHA	III - IV	II	III	II
Traitement médical	IEC Diurétiques Digitaliques	IEC	IEC Diurétiques Digitaliques	IEC Digitaliques
ECG	Fibrillation auriculaire	Rares ESA	Fibrillation auriculaire	Tachycardie sinusale
Atteinte ventriculaire	Gauche + droite	Gauche	Gauche + droite	Gauche

CMD cardiomyopathie dilatée
 IEC inhibiteur de l'enzyme de conversion
 NYHA New York Heart Association
 ECG électrocardiogramme
 ESA extrasystole auriculaire

Tableau VI : Echographie pré opératoire chez les 4 chiens de la série

CHIEN	CHIEN n°1	CHIEN n°2	CHIEN n°3	CHIEN n°4
VolSystInd ml/M2	182,04	61,59	130,46	67,79
PPVGs mm	10,9	13	10,9	17,4
FE %	13	51	35	41
FR %	6	26	17	20
PP %	8	35	24	21
EAAO mm	0	9,7	5,5	9,6
ES	21,4	4,2	15,9	9,6
AG/Ao	2,43	1,04	1,47	0,85
Reflux mitral	Important	Modéré	Important	Modéré
Veine cave Inférieure	Dilatée	Normale	Dilatée (ascite+++)	Normale
Atteinte ventriculaire	Gauche et droite	Gauche	Gauche et droite	Gauche

VGs mm diamètre systolique du ventricule gauche
 VolSystInd ml/m2 volume systolique indexé à la surface corporelle
 PPVGs mm paroi postérieure du ventricule gauche en systole
 FE % fraction d'éjection
 FR % fraction de raccourcissement
 PP % pourcentage d'épaississement de la paroi postérieure du ventricule gauche
 EAAO mm excursion aortique antérieure
 AG/Ao diamètre atrial gauche / diamètre de l'aorte
 ES mm distance point E (excursion protodiastolique du feuillet mitral) / point S (septum)

Photo 16 : chiens n°1 (berger allemand mâle de 13 ans), n°2 (bobtail mâle de 10 ans)
et n°4 (danois mâle de 8 ans) (clichés : N Borenstein)



Deux groupes se distinguent clairement au sein des 4 chiens : deux chiens étaient atteints d'une insuffisance cardiaque débutante (chiens n°2 et 4), les deux autres étaient atteints d'une insuffisance cardiaque gauche et droite sévère (chiens n°1 et 3). Ces deux derniers présentaient une dilatation ventriculaire et auriculaire gauche et droite, un amincissement de la paroi du ventricule gauche, une fraction de raccourcissement très diminuée, une excursion antérieure de l'aorte très faible (nulle pour le chien n°1), des reflux mitral et tricuspide importants et une fibrillation auriculaire. Les deux autres chiens avaient des troubles du rythme moins conséquents, n'avaient qu'un début de dilatation ventriculaire, une fraction de raccourcissement anormale mais supérieure ou égale à 20 et des reflux mitral et tricuspide fonctionnels modérés. La comparaison des volumes systoliques indexés à la surface corporelle (paramètre d'évaluation de la fonction systolique), amène également une distinction très nette entre les deux groupes de chiens : 182,04 ml/m² et 130,46ml/m² pour les chiens n°1 et 3 respectivement, alors que les chiens n°2 et 4 ont des valeurs de 61,59 ml/m² et 67,79 ml/m² respectivement. Les normes sont les suivantes :

Fonction myocardique normale	< 30 ml/m ²
Insuffisance myocardique modérée	[30 – 70] ml/m ²
Insuffisance myocardique moyenne	[70 – 100] ml/m ²
Insuffisance myocardique sévère	> 100 ml/m ²

B - Evaluation clinique des animaux en pré- et post-transplantation

Le Tableau VII présente les résultats cliniques obtenus après greffe. L'amélioration clinique est apparue en un mois pour les chiens n°2 et 4. Les deux autres chiens sont décédés pendant la phase post-opératoire. Leur évolution est discutée dans le paragraphe « Complications post-opératoires » de ce chapitre.

Tableau VII : Evolution clinique des chiens après la greffe

	Pré-greffe	Post greffe
Chien n°1	Classe NYHA III – IV	Mort subite à J+10
Chien n°2	Classe NYHA II	Classe NYHA I, à 4 mois
Chien n°3	Classe NYHA III	Thrombo-embolie à J+1 Mort à J+5
Chien n°4	Classe NYHA II	Classe NYHA I, à 2 mois

NYHA New York Heart Association

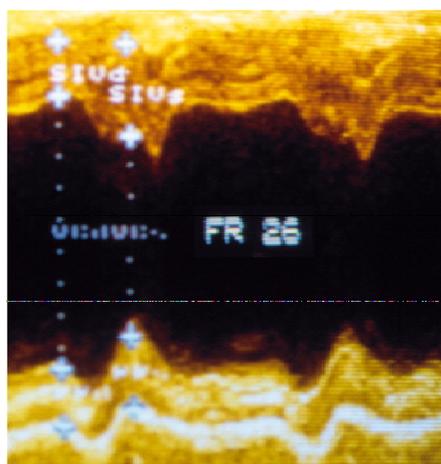
C - Evaluation hémodynamique et de la viabilité myocardique pré- et post-transplantation

1 - Echographie Doppler classique

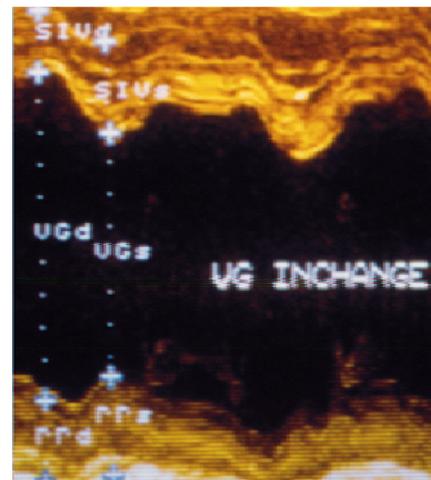
Seuls les chiens ayant survécu à la phase post-opératoire ont eu des échographies après la greffe (chiens n°2 et 4). Les résultats comparatifs ne portent donc que sur ces deux chiens pour des périodes post-opératoires respectives de 4 mois et 2 mois.

Les Figures 11 à 15 montrent l'amélioration marquée de plusieurs paramètres pour ces deux chiens.

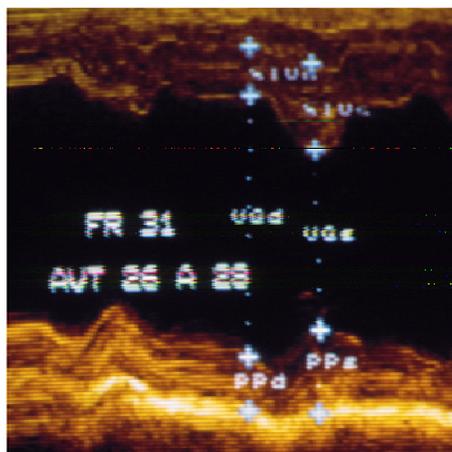
Figure 11 : Echographie pré et post opératoire en mode temps-Mouvement : évolution de la fraction de raccourcissement chez le chien n°2, 15 jours, 30 jours et 60 jours après l'implantation cellulaire (clichés : V. Chetboul)



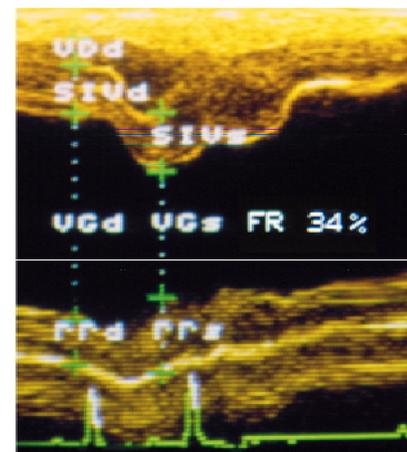
J0



J0+15



J0+30



J0+60

Les volumes systoliques indexés à la surface corporelle montrent une nette diminution après la greffe. Les fractions de raccourcissement ont augmenté de 26 à 36 % chez le chien n°2, à 4 mois post-opératoires, et de 20 à 24 % chez le chien n°4, à 2 mois post-opératoires. L'augmentation de ces deux paramètres est donc modérée chez ce dernier chien. Une des raisons est que les diamètres télésystolique et télédiastolique du ventricule gauche ont diminué tous les deux. La différence n'a donc que peu varié. L'épaisseur de la paroi du ventricule gauche ainsi que le pourcentage d'épaississement de cette paroi a également augmenté chez ces deux chiens. L'excursion aortique antérieure est passée de 9,7 mm à 11,9 mm pour le chien n°2, et de 9,6 mm à 12,3 mm chez le chien n°4. Ces résultats traduisent, dans leur ensemble, une amélioration nette de la fonction systolique et un épaississement pariétal.

Figure 12 : Volume systolique indexé à la surface corporelle (exprimé en ml/m²), sur les chiens n°2 et 4 avant et après l'implantation de cellules

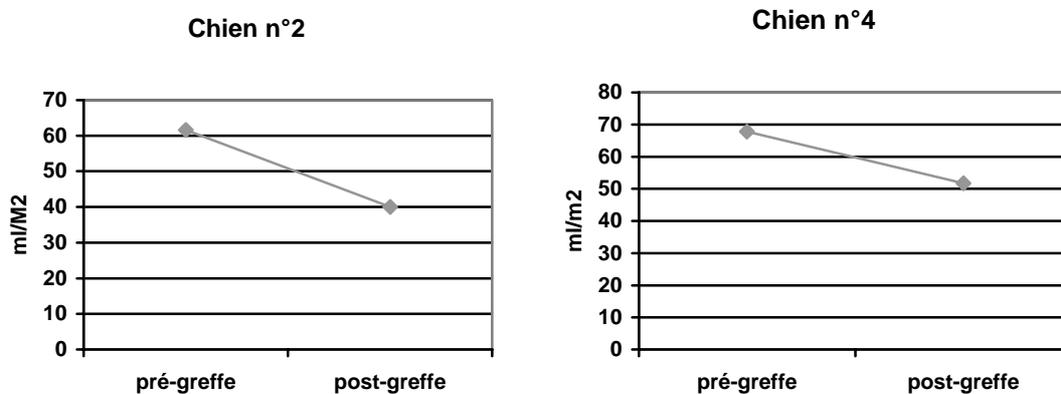


Figure 13 : Fraction d'éjection (FE) et fraction de raccourcissement (FR) sur les chiens n°2 et 4 et après l'implantation de cellules

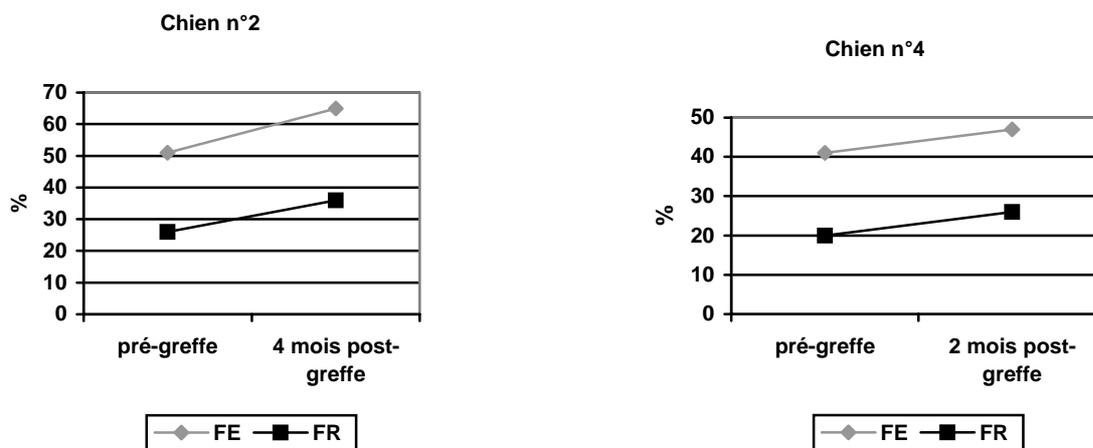


Figure 14 : Epaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche en systole (PPVGs) et pourcentage de contraction de cette paroi (PP %) sur les chiens n°2 et 4 avant et après l'implantation de cellules)

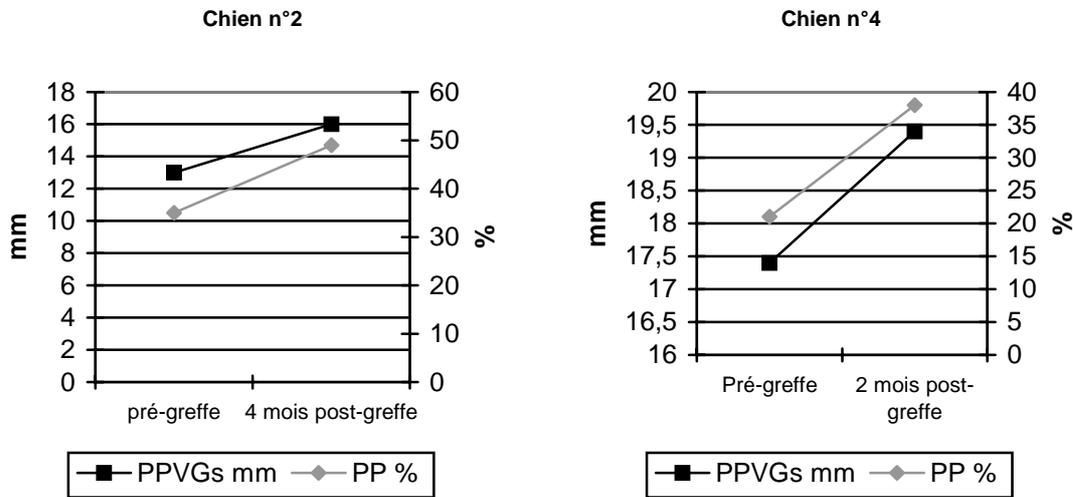
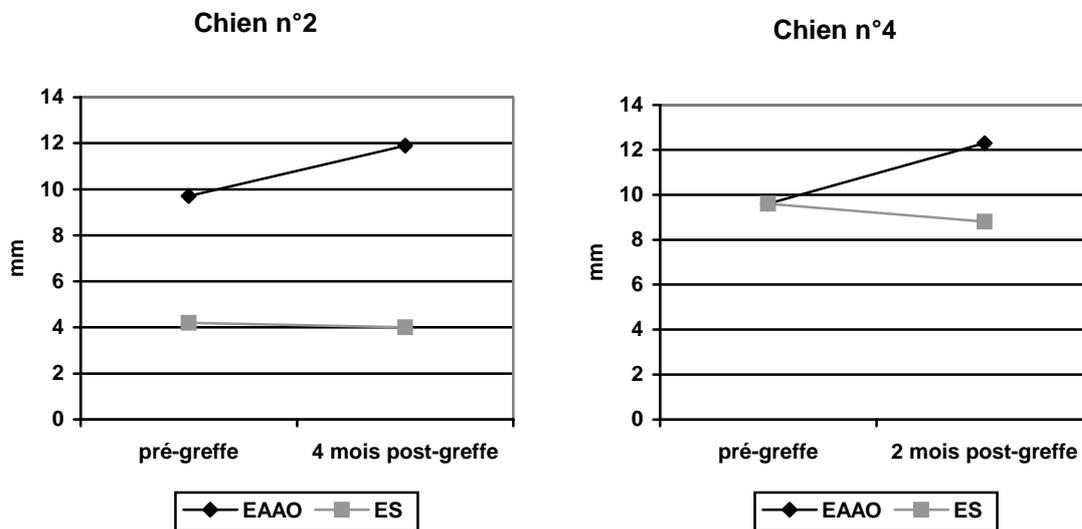


Figure 15 : excursion aortique antérieure (EAAO) et espace ES sur les chiens n° 2 et 4 avant et après l'implantation de cellules



2 - Echographie Doppler tissulaire

Cet examen a été pratiqué respectivement à trois mois et trois semaines post-opératoires pour les chiens n°2 et n°4. Les images ont été comparées aux résultats obtenus sur le chien doberman atteint d'une CMD mais non opéré, ainsi qu'à une série de chiens sains préalablement étudiée, pour une expérimentation sans rapport avec notre travail. [Derumeaux, résultats non publiés].

Les chiffres présentés dans le tableau VIII indiquent des vitesses myocardiques effondrées et une disparition du gradient de vitesse moyen endo-épicardique chez le doberman non opéré. Les résultats obtenus sur les deux chiens sont intermédiaires entre les chiens sains et le chien doberman.

Les images obtenues sur les zones non greffées des chiens n°2 et 4 ont été évaluées de façon qualitative. La position de la sonde, l'angle avec le ventricule gauche en coupe « petit axe », la polypnée des chiens (jour de forte chaleur) et la qualité des images acquises au cours de l'échographie DTI n'ont pas permis la quantification précise des vitesses dans les zones non greffées. L'appréciation qualitative par l'opérateur a déterminé des vitesses moyennes plus faibles pour ces zones que dans le reste du ventricule gauche.

Tableau VIII : Comparaison des vitesses myocardiques et des gradients de vitesse endo-épicardiques chez les chiens n°2 et 4, ainsi que sur un chien atteint de CMD non greffé et une série de chiens sains

	Chiens sains (moyenne sur 13 animaux anesthésiés)	Chien n°2	Chien n°4	Chien doberman non traité (référence)
<i>Vélocité systolique épicardique moyenne (cm/s)</i>	1,8 +/- 0,2	0,8	1,2	0,8
<i>Vélocité systolique endocardique moyenne (cm/s)</i>	5,2 +/- 0,5	2,5	3	1
<i>Gradient moyen endocarde/épicarde (cm/s)</i>	3,5 +/- 0,4	1,7	2	0

3 - Scintigraphie myocardique au Thallium

Lors de la première scintigraphie chez le chien n°4, la fréquence cardiaque était de 110 par minute et la tension artérielle de 120/80 pendant l'anesthésie.

Lors de la deuxième scintigraphie, la fréquence cardiaque était de 75 par minute et la tension artérielle de 135 / 80 pendant l'anesthésie.

Avant la greffe, l'hypofixation était de 97 % à l'apex (15 % en grade 2 et 82 % en grade 3). Pour le segment antéroapical, l'hypofixation était de 56 % en grade 3. Pour le segment inféroapical, l'hypofixation était de 25 % (7 % en grade 2 et 18 % en grade 3). Dans les segments médians, elle était modérée (grade 3 : 8 % en antérieur et 13 % en septal).

Après la greffe, l'hypofixation n'était plus que de 48 % à l'apex (0 % en grade 2 et 48 % en grade 3) (voir Figure 16, Figure 17 et Figure 18). Dans le segment antéroapical, la fixation était anormale. Pour le segment inféroapical, 16 % était en grade 3. Pour le segment septoapical, 29 % était en grade 3. Le segment septal médian restait stable avec 13 % en grade 3.

Figure 16 : Scintigraphie myocardique au thallium chez le chien n°2 (coupe sagittale),
4 jours avant et 21 jours après la greffe.

Noter l'augmentation de la viabilité myocardique en région apicale (cliché : Dr Toussaint)

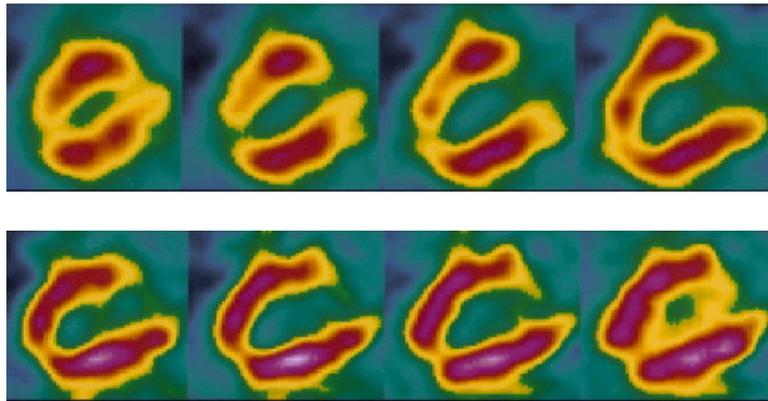
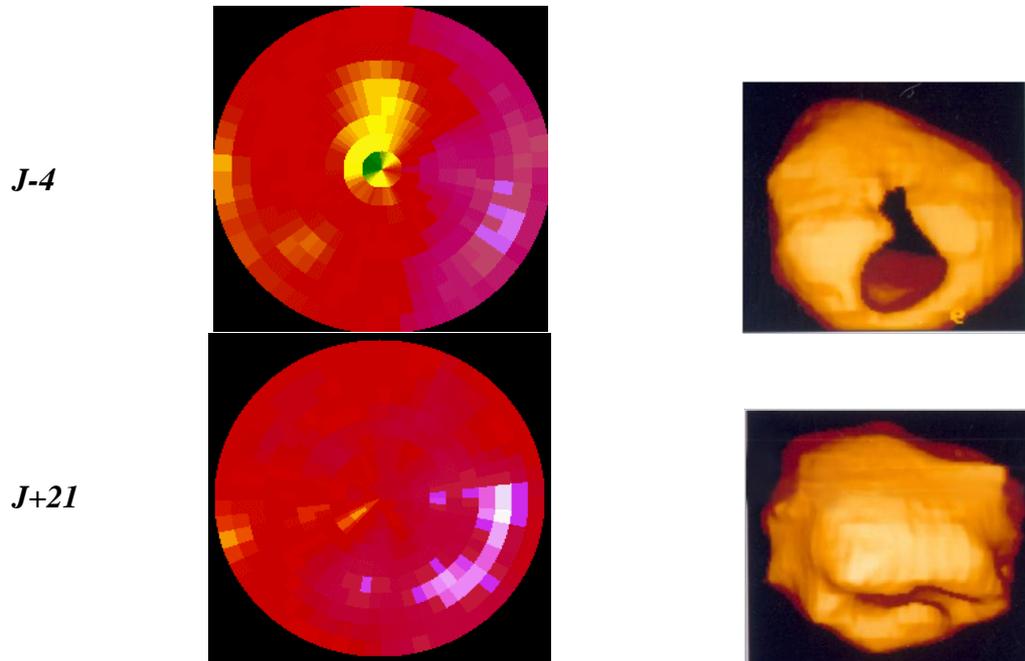


Figure 17 : Scintigraphie myocardique au thallium chez le chien n°2 (coupe frontale),
4 jours avant et 21 jours après la greffe.

Noter l'augmentation de la viabilité myocardique en région apicale (cliché : Dr Toussaint)



Figure 18 : Scintigraphie myocardique au thallium chez le chien n°2 (bull's eye à gauche, et traduction par reconstruction tridimensionnelle -3D- à droite), 4 jours avant et 21 jours après la greffe. Noter la réduction de la zone de faible viabilité myocardique (coloration jaune et verte, au centre pour le bull's eye, et trou virtuel pour la reconstruction 3D) (cliché : Dr toussaint)



D - Prélèvements sanguins

Les CPK (créatinine phosphokinase) (chiens n°2, 3 et 4) et troponine (chien n°4), à 24h avant et 48h après la greffe, sont données dans la Figure 19 et la Figure 20. Les résultats traduisent une inflammation sévère du myocarde en post-opératoire. Pour les CPK, les résultats les plus élevés ne correspondent pas aux chiens qui sont décédés.

Figure 19 : Evolution de la troponine sérique chez le chien n°4, 24 h avant, 48 h et 21 j après la greffe

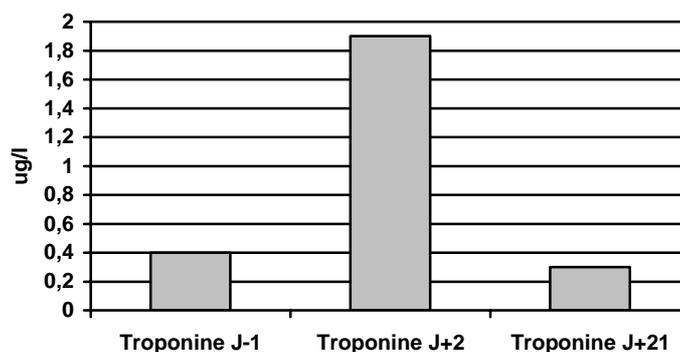
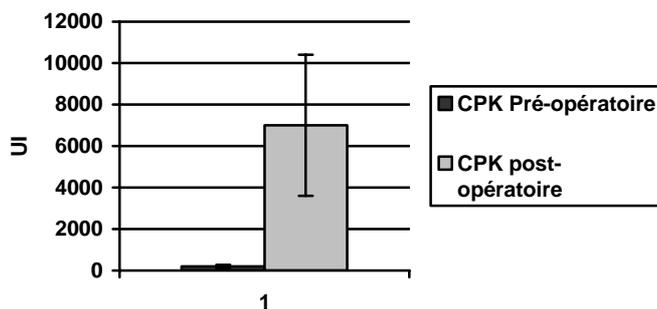


Figure 20 : Evolution des CPK chez les chiens n°2, 3 et 4, 24h avant et 48 h après la greffe



E – Complications post-opératoires

Deux des 4 chiens opérés sont morts pendant la phase postopératoire (chiens n°1 et n°3).

Le chien n°1 est mort à J+10 d'une cause non expliquée par l'autopsie. Ce chien présentait une insuffisance cardiaque gauche et droite très avancée, était en classe III/IV de la NYHA, et avait une fraction de raccourcissement de l'ordre de 6% en préopératoire. La durée d'hospitalisation avait été de 7 jours sur ce chien. Après un abatement postopératoire avec polypnée et la persistance d'un épanchement pleural (de type transsudat modifié) pendant 4 jours après l'intervention, son état clinique s'était régulièrement amélioré avec comme seule modification thérapeutique l'adjonction d'un deuxième diurétique (altizide/spironolactone, ALDACTAZIDEND) à son traitement préexistant (furosémide, bénazépril, digoxine).

Les propriétaires du chien ont confirmé avoir retrouvé leur chien dans un état comparable à l'état pré opératoire à sa sortie de l'Ecole Vétérinaire. Trois jours plus tard, le chien est mort subitement chez ses propriétaires après une sortie hygiénique. L'autopsie a révélé un épanchement séro-hémorragique d'environ 250 ml (jugé modéré pour un chien de 40 Kg), une ascite d'environ 1 L et une hépatomégalie sévère vraisemblablement d'origine cardiaque.

Le tableau clinique correspondait à une mort subite par trouble du rythme, fréquemment décrite chez les chiens atteints de cardiomyopathie dilatée. Il est à noter que ce chien avait une fibrillation atriale avant et après l'intervention mais n'avait aucune extrasystole ou autre anomalie du rythme ventriculaire après l'intervention. Le péricarde n'avait pas été suturé chez ce chien. L'incision de péricardiotomie a systématiquement été refermée chez les chiens suivants.

Le chien n°3 est également mort pendant la phase postopératoire à J+5, alors qu'il était encore hospitalisé. Le chien a présenté des symptômes compatibles avec une thrombo-embolie pulmonaire : abatement, polypnée et orthopnée d'apparition subite 24 heures après l'intervention, sans explication cardiaque ou pleurale de cet état. En dehors d'une fibrillation auriculaire préexistante, aucune anomalie rythmologique n'a été notée. Le fait que cette polypnée se soit sensiblement atténuée jusqu'à disparaître avec une oxygénothérapie par canule nasale ainsi qu'une

héparinothérapie, était également compatible avec le diagnostic. Après une amélioration constante et le retour à un état clinique satisfaisant, le chien est mort après quelques minutes d'une polypnée avec orthopnée intense, sans réponse aux efforts de réanimation de l'équipe vétérinaire. L'autopsie a révélé un pneumothorax dans l'hémithorax droit (côté non opéré), plusieurs zones d'érosion de surface pulmonaire ainsi que des bulles d'emphysème marginales sur les lobes pulmonaires droits. L'autopsie a également révélé un épanchement pleural de 100 ml et une ascite d'au moins 4 L (le chien pesant 35 Kg). Aucun thrombus n'a été retrouvé dans les gros troncs artériels de la base du cœur. L'analyse histologique des zones d'érosion a confirmé la présence d'infarctus pulmonaires, complications probables de la thrombo-embolie. La mort a donc été attribuée à une bulle d'emphysème ou du parenchyme pulmonaire suite à la thrombo-embolie. Suite à cet épisode, le chien n°4 a reçu une héparinothérapie prophylactique en postopératoire.

Pour ces deux chiens, les cœurs n'ont pas révélé de lésions macroscopiques particulières en rapport avec la procédure d'implantation. En revanche, comme l'avaient montré les échocardiographies et les thoracotomies sur ces deux chiens, les cœurs étaient très dilatés et les parois des deux cavités très amincies. L'analyse histologique des cœurs prélevés est discutée dans le paragraphe suivant.

Aucune autre complication n'a été notée sur les deux autres chiens de la série.

F – Analyses histologiques des cœurs greffés

L'analyse histologique en microscopie optique a confirmé la présence de lésions compatibles avec une cardiomyopathie dilatée idiopathique dans les zones non greffées chez les deux chiens : cellules musculaires cardiaques modérément ondulées (« wavy fibers »), hypertrophie myocytaire, fibrose intercellulaire d'intensité variable selon les zones. Les seules lésions intracellulaires retrouvées en microscopie électronique étaient des anomalies de la strie Z.

L'analyse particulière des zones greffées chez les deux chiens a permis d'identifier plusieurs plages cellulaires contenant une fibrose, un infiltrat inflammatoire discret et des cellules fusiformes ne ressemblant pas aux cardiomyocytes environnants. Une néovascularisation a également été observée au centre de ces plages. Les coupes correspondantes ont été traitées par une technique immunohistochimique révélant la desmine et l'actine. Ces deux protéines ont été révélées sur tout le tissu myocardique environnant les plages cellulaires (cellules myocardiques natives). L'actine a été révélée sur de nombreuses cellules incluses dans ces plages ; en revanche, la desmine n'a pas été révélée sur ces cellules. Ces cellules ont été interprétées comme des fibroblastes activés ou myofibroblastes. Les myoblastes greffés n'ont donc pas été retrouvés sur les coupes. De même, ils n'ont pas été observés sur les fragments analysés en microscopie électronique. La conclusion histologique est donc celle de lésions myocardiques traumatiques aspécifiques.

DISCUSSION

I – MODELE

L'originalité du modèle utilisé repose sur la nature spontanée de la cardiomyopathie dilatée idiopathique (CMD), mimant sur de nombreux points, tant cliniques qu'hémodynamiques et histologiques, la maladie humaine, et plus généralement l'insuffisance cardiaque. Elle repose également sur la taille des animaux opérés qui font partie des races les plus grandes du genre canin. Cette stratégie est une étape impérative avant le passage à une utilisation humaine de l'implantation de cellules dans le myocarde, en accord avec les recommandations de l'INSERM pour le développement d'applications cliniques en thérapie cellulaire.

L'intérêt du modèle ne s'appuie pas uniquement sur cette ressemblance physiopathologique mais également sur le contexte strictement clinique de cette expérimentation. Toutes les étapes effectuées au cours de ce travail seront nécessaires lors d'une future application chez l'homme : mise au point d'une technique de culture optimale, conservation, conditionnement et transport des myoblastes, éventuelle organisation d'une banque de cellules, sélection des cas, mise au point de la technique chirurgicale, suivi postopératoire et détermination de la meilleure technique d'imagerie pour évaluer l'efficacité de l'implantation.

La cardiomyoplastie cellulaire a été appliquée ici sur des animaux appartenant à des propriétaires volontaires venant consulter à l'École Vétérinaire d'Alfort ; ils ont été pleinement avertis du but et des risques de cette nouvelle thérapeutique. L'intérêt du contexte clinique est également un des écueils de ce modèle : difficultés pour motiver à participer des propriétaires très attachés à leur animal, contexte émotionnel rendant l'organisation de l'expérimentation moins souple, recrutement plus ou moins difficile selon le nombre de CMD rencontrés dans l'année.

Outre ces difficultés d'ordre humain, l'état très avancé d'insuffisance cardiaque d'une grande partie des chiens atteints de CMD rencontrés en pratique vétérinaire, pose des problèmes techniques et financiers supplémentaires (coût très important de l'anesthésie et de la réanimation sur des animaux hémodynamiquement instables). Les deux chiens décédés dans les jours qui ont suivi l'intervention avaient tous deux une atteinte biventriculaire majeure, ainsi qu'une fibrillation atriale. L'état de ce genre de candidat impose de développer, à l'avenir, des méthodes moins invasives.

II – TECHNIQUE DE CULTURE DE MYOBLASTES

Plusieurs types de cellules ont été greffés dans la paroi myocardique par les différentes équipes travaillant sur la cardiomyoplastie cellulaire. Comparée aux cardiomyocytes, la greffe de cellules satellites présente un avantage de disponibilité et de culture. Les cardiomyocytes fœtaux posent un problème d'immunosuppression et d'approvisionnement ; ils soulèvent également des questions éthiques qui les rendent improbables d'utilisation en médecine humaine. La culture des cardiomyocytes adultes ne semblent être maîtrisée que par un seul groupe de chercheurs travaillant

sur la transplantation cellulaire et posent encore des problèmes de techniques (Li *et al* (2000)). Si cette stratégie apparaît séduisante pour le traitement d'un infarctus (prélèvement en zone saine de cardiomyocytes transplantés dans la région atteinte), elle est peu applicable au domaine de la cardiomyopathie dilatée, où toutes les cellules myocardiques peuvent comporter des altérations diverses et contiennent un génotype à l'origine de cette maladie. La greffe de cellules souches originaire de la moelle osseuse, artificiellement différenciées en cardiomyocytes, est également une alternative intéressante (Tomita *et al* (1999)) ; mais la greffe de myoblastes reste l'option la plus simple : les cellules sont accessibles en grand nombre, leur culture ne posent pas de difficultés particulières et plusieurs équipes ont déjà montré l'intérêt fonctionnel de leur transplantation (Chiu *et al* (1995) et Murry *et al* (1996)). De plus, la nature autologue de cette transplantation permet d'éviter les complications associées à l'immunosuppression. C'est donc l'option qui a été choisie dans le cadre de ce travail.

Les biopsies du muscle sartorius prélevé sur les chiens atteints de cardiomyopathie dilatée n'ont révélé aucune anomalie histologique en microscopie optique et électronique. Cette question n'avait jamais été envisagée dans la littérature vétérinaire. Le fait qu'aucune myopathie périphérique n'ait été détectée sur ces chiens autorise raisonnablement l'utilisation des cellules satellites autologues pour l'implantation myocardique.

De plus, des anomalies musculaires de nature trophique, métabolique, ischémique ou consécutives à la non utilisation sont associées à l'insuffisance cardiaque chez l'homme (Chachques *et al* (1997)). Ces modifications, en particulier en terme de métabolisme énergétique oxydatif, pourraient avoir des conséquences sur la vitalité des cellules satellites. Aucune différence de morphologie ou de taux de croissance cellulaire n'a été remarquée entre les cellules issues des chiens atteints de CMD et les cellules issues des chiens sains, utilisées pendant la phase de mise au point de la technique.

De nombreuses publications font état de techniques pour la culture de myoblastes chez le rat ou chez d'autres animaux de laboratoire. Peu de littérature est, en revanche, disponible sur la culture primaire de myoblastes de chien (Chiu *et al* (1995)).

Les techniques publiées font pour la plupart état d'une extraction des cellules satellites par des méthodes enzymatiques. Aucune publication n'a comparé les rendements de diverses techniques en terme de temps, de culture et de richesse de myoblastes issus de cultures primaires. Les résultats que nous avons obtenus sont le fruit de nombreuses phases d'essai. Plusieurs mois ont été nécessaires pour obtenir une technique de culture efficace. Des trois techniques appliquées aux biopsies de muscle sartorius, la technique mono enzymatique à base de collagénase se détache des deux autres (méthode multi enzymatique et méthode sur explant) : un grand nombre de cellules (5.10^7 cellules) contenant au moins 93% de myoblastes ont pu être obtenues en 11 à 14 jours. Cette technique s'est révélée plus rapide, plus simple, plus reproductible et moins chère que les deux autres. C'est la technique qui a été appliquée pour la continuation expérimentale de ce protocole. Elle a été par la suite améliorée pour s'affranchir totalement de la phase de culture. Cette technique, nouvelle et originale, ne fera pas l'objet de plus détails dans ce travail (Suzuki *et al* (2002)).

III – TECHNIQUE CHIRURGICALE

Le choix de pratiquer 20 injections, contenant chacune $2,5.10^6$ cellules, réparties sur un territoire représentant la moitié de la surface cardiaque, nous a semblé être un compromis approprié pour le traitement d'une insuffisance cardiaque par cardiomyopathie dilatée. Un nombre trop faible d'injections aurait pu être insuffisant pour traiter une atteinte myocardique diffuse. Un trop grand nombre d'injections aurait pu déterminer une inflammation trop importante. La stratégie adoptée impose un abord large pour une bonne visualisation des sites d'implantation sur les deux ventricules. La contrepartie se retrouve en terme de temps opératoire et de lourdeur des soins pendant la phase postopératoire. Il est donc important de développer, à l'avenir, des méthodes peu invasives : mini-thoracotomie, thoracoscopie, méthodes endomyocardiques.

Des troubles du rythme ventriculaires n'ont été rencontrés qu'au moment de la pénétration de l'aiguille. Des salves d'extrasystoles ont disparu après quelques secondes et n'ont été retrouvés ni pendant la phase de surveillance postopératoire par Holter, ni lors des visites de contrôles dans les mois suivant l'intervention. Cette information est intéressante et répond aux inquiétudes légitimes de voir les sites greffés se transformer en foyers arythmogènes.

Les injections pratiquées dans le myocarde ne sont néanmoins pas anodines, comme le démontrent l'élévation très importante des CPK et de la troponine sérique ainsi que les zones de lésion myocardique traumatique retrouvées par l'histologie des zones greffées, à 5 et 10 jours. Cette élévation transitoire des enzymes cardiaques après transplantation a déjà été documentée (Koh *et al* (1993)).

IV – RESULTATS SUR L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

A – Etat clinique des animaux

Environ un mois après l'implantation, les deux chiens qui ont survécu à leur période postopératoire ont démontré le début d'une amélioration clinique qui s'est prolongée jusqu'à la disparition des symptômes d'intolérance à l'effort. Cet élément est difficile à évaluer pour la raison suivante : il existe, chez le chien, une polypnée dite « thermique » qui lui permet de réguler sa température corporelle. Cette polypnée peut être confondue avec un essoufflement à l'effort. Les propriétaires ont donc été informés de cette particularité. L'évaluation clinique a ainsi été fondée sur les capacités du chien à supporter un effort habituel (promenade hygiénique) ou important (phase de jeu, promenade supérieure à une heure, trot pendant quelques heures). Ces éléments ont été comparés à l'état du chien avant la greffe et plusieurs mois avant le diagnostic de l'insuffisance cardiaque.

L'évolution notée est compatible avec les résultats hémodynamiques enregistrés.

B – Echographie doppler couleur

L'échographie est la méthode non invasive la plus facilement accessible et la moins coûteuse pour l'évaluation de la morphologie pariétale et de l'hémodynamique cardiaque.

Les résultats obtenus sur les deux chiens opérés vont dans le sens d'une nette amélioration de la fonction systolique, évaluée ici par le volume systolique indexé à la surface corporelle et la mesure de la fraction de raccourcissement.

Associés à ces résultats, un épaissement pariétal et une augmentation du pourcentage d'épaississement de cette paroi, au cours du cycle cardiaque, ont été enregistrés. Cet épaissement pourrait être la conséquence directe de l'implantation cellulaire, de l'éventuelle incorporation et de la prolifération des myoblastes dans le myocarde ; cette observation a déjà été rapportée par d'autres équipes sur des modèles d'infarctus expérimentaux (Murry *et al* (1996)).

Ces améliorations hémodynamiques sont corroborées par les résultats obtenus en échographie Doppler tissulaire et en scintigraphie.

C – Echographie doppler tissulaire

L'échographie Doppler tissulaire myocardique apparaît comme une des meilleures techniques non invasives d'évaluation de la fonction pariétale segmentaire du cœur (Derumeaux *et al* (1997)). L'enregistrement des vitesses intramurales, à l'échelon tissulaire, permet d'établir des gradients de vitesses de l'endocarde vers l'épicarde (du plus rapide vers le moins rapide), traduits par différentes échelles de couleurs. Le gradient de vélocité systolique peut disparaître dans les cardiomyopathies dilatées et se révèle être un excellent paramètre pronostique, tant pour la survenue d'un événement cardiaque grave que pour la réalisation d'une transplantation cardiaque chez l'homme (Derumeaux *et al* (1997)). Le chien doberman non opéré présentait également une disparition de ce gradient. Les deux chiens opérés, en revanche, gardaient un gradient et des vitesses moyennes systoliques proches de la normale. Cet examen n'ayant pas été réalisé en préopératoire, d'une part, et la quantification précise des vitesses au sein des zones non greffées n'ayant pas été possibles, d'autre part, les résultats ne nous permettant pas de démontrer un gain, en terme de vitesse myocardique, chez les deux chiens greffés. La mise en place de cet examen nouveau et encore peu exploité pose les bases d'une prochaine série, qui bénéficiera d'un examen pré- et postopératoire.

D – Scintigraphie cardiaque

Malgré la nature non ischémique de la cardiomyopathie dilatée, une hétérogénéité de la fixation du thallium et des zones d'hypoperfusion sont souvent décrites chez l'homme au cours de cette affection. Le but de la procédure de cardiomyoplastie cellulaire, sur ces chiens atteints d'une pathologie diffuse, était d'obtenir, sur de multiples sites, des effets dont la sommation déterminerait une amélioration fonctionnelle globale. Le but n'était donc pas, à l'origine, de greffer une zone

particulière d'infarctus comme l'ont pratiqué la grande majorité des équipes travaillant sur ce sujet. La scintigraphie ayant révélé une zone apicale de faible viabilité, facile d'accès et relativement petite, la stratégie a été sur ce chien de concentrer plusieurs injections dans cette localisation. L'amélioration sensible de la fixation du Thallium dans la zone apicale (augmentation d'environ 50% de la zone de viabilité myocardique), peut s'expliquer par une amélioration de la microcirculation coronaire (réduction de l'ischémie de repos par une augmentation de la perfusion tissulaire) et/ou par une augmentation du nombre de cellules viables. Ce résultat amené par la scintigraphie corrobore des résultats présentés par d'autres équipes (Li *et al* (2000)). Il reste à déterminer si la scintigraphie cardiaque est la meilleure méthode d'exploration pour évaluer l'efficacité de la cardiomyoplastie cellulaire dans le cadre d'une affection de forme dilatée ou si elle doit faire place à des technologies plus fines tant en résolution qu'en quantification de la contractilité et de la perfusion myocardique (Tomographie par Emission de Positron, Imagerie par Résonance Magnétique (Skoufis et McGhie (1998))).

Les résultats fonctionnels extrêmement encourageant enregistrés sur les deux chiens suivis respectivement à 2 et 4 mois, confirment l'intérêt de la cardiomyoplastie cellulaire dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Ces résultats obtenus sur une insuffisance cardiaque spontanée et idiopathique confirment le bénéfice fonctionnel obtenu *in vivo* par plusieurs autres équipes, sur des modèles induits par des lésions cardiaques focales (infarctus expérimental localisé (Li *et al* (2000), Taylor *et al* (1998), Murry *et al* (1996) et Marelli *et al* (1992)) ou diffus (Scorsin *et al* (1998))).

V – Résultats histologiques

Au sein des zones greffées, des plages myocardiques contenant des amas cellulaires, de nombreuses cellules fusiformes, quelques macrophages et cellules inflammatoires ainsi que des images de mitose ont été observées. Ces cellules fusiformes ont été interprétées comme des fibroblastes activés. Le pourcentage de myoblastes contenus dans les cellules greffées étant de plus de 90%, plusieurs hypothèses découlent de ces observations :

- 1) les prélèvements effectués sur les cœurs des animaux autopsiés ne contenaient pas les centres d'injection précis mais les zones situées en périphérie
- 2) les myoblastes greffés ont subi une transdifférenciation en myofibroblastes
- 3) la technique immunohistochimique utilisée ne permet pas de révéler la desmine dans le tissu greffé
- 4) la majorité des cellules greffées sont ressorties par le canal d'injection créé dans le myocarde
- 5) les cellules greffées ont toutes été détruites pendant les 5 à 10 jours ayant suivi la greffe.

L'absence des cellules transplantées au cœur des zones d'injection a déjà été notée par plusieurs équipes sur certains ou sur tous les lots d'animaux greffés (Dorfman *et al* (1998), Scorsin *et al* (1998) et Taylor *et al* (1998)), malgré une amélioration fonctionnelle sur les cœurs greffés (Scorsin *et al* (1998) et Taylor *et al* (1998)).

Le rejet n'est pas ici envisageable sur ce modèle de greffe autologue. De plus, les cellules ont été rincées plusieurs fois au moment du conditionnement et transportées dans du sérum également autologue. Une éventuelle destruction pourrait être le fruit de la réaction inflammatoire déterminée par la pénétration de l'aiguille. L'absence d'une forte infiltration inflammatoire (seuls quelques

macrophages sont présents) à 5 jours post-greffe ne semble pas compatible avec cette hypothèse. Seule une petite quantité de la suspension cellulaire ressort par le trou d'injection dans les secondes suivant l'injection. Mais cette ressortie pourrait diminuer le nombre de cellules implantées et les chances de les retrouver sur des coupes histologiques, même très proches du site de greffe. Deux sites d'injection ont été repérés, pour chaque chien, par des points de suture épicaudiques. Cette technique n'a pas été répétée pour chacune des 20 injections pour diminuer le temps opératoire et par peur d'induire une réaction inflammatoire autour du fil de suture, éventuellement responsable de la mort d'une partie des cellules greffées. Malgré le repérage épicaudique sur deux zones d'injection, il est possible de passer à côté de la zone centrale lors de la préparation des prélèvements.

La technique immunohistochimique utilisée est une technique standard. La desmine a été systématiquement révélée dans le tissu myocardique natif ainsi que dans la paroi des vaisseaux myocardiques. Il semble peu probable que la desmine contenue dans le cytosquelette des myoblastes, parfaitement révélée sur les cultures cellulaires, ne soit pas exprimée et mise en évidence par la technique utilisée, dans ces mêmes cellules après implantation. La transdifférenciation en myofibroblastes reste une possibilité. Cette modification phénotypique des cellules greffées irait à l'inverse des observations rapportées par d'autres équipes travaillant sur l'implantation de myoblastes dans le myocarde, des études publiées sur la transformation *in vivo* et *in vitro* de fibroblastes en myoblastes (Murry *et al* (1996), et des résultats hémodynamiques observés sur les deux chiens suivis 2 et 4 mois après l'implantation.

En conclusion, il est vraisemblable que les prélèvements réalisés sur les zones greffées ne contenaient pas les centres réels d'injection. A l'avenir, plusieurs injections seront réalisées à quelques millimètres d'intervalle et cette zone sera repérée par des points épicaudiques moins espacés. Le prélèvement contiendra la totalité de la zone avec les points de suture, et le bloc inclus en paraffine sera plus large. Les prélèvements qui seront réalisés lors du décès des deux chiens encore en vie à l'heure actuelle seront également élargis. Cette prochaine analyse sera particulièrement riche d'enseignement sur ces animaux qui ont, tous deux, manifesté une amélioration clinique et hémodynamique.

VI – COMPLICATIONS

Les complications rencontrées sur les chiens n°1 et 3 semblent être la conséquence de l'intervention chirurgicale et non de l'implantation cellulaire. Malgré l'absence de trouble du rythme ventriculaire détecté sur le chien n°1 pendant la phase d'hospitalisation postopératoire, les circonstances aiguës de son décès et l'absence d'anomalie particulière retrouvée pendant l'autopsie, évoquent une mort subite par trouble du rythme. Le péricarde de ce chien n'avait pas été refermé. Cet élément pourrait avoir causé une désynchronisation des ventricules, phénomène hautement arythmogène. La thrombo-embolie pulmonaire rencontrée chez le chien n°3 peut être la conséquence de l'acte opératoire sur ce chien sévèrement insuffisant cardiaque. Les multiples cathéters (une voie veineuse centrale, deux voies veineuses périphériques, une voie artérielle) pourraient également être à l'origine de cette complication. L'injection intramyocardique ou, par erreur, intraventriculaire droite de myoblastes, pourraient potentiellement causer la formation d'un thrombus sur la surface endocardique et déterminer une embolie. Cette hypothèse semble peu probable ; en effet, le contrôle de la position intramyocardique a été systématiquement réalisé par retrait du piston de la seringue

avant l'injection. Un traitement anticoagulant à base d'héparine a été administré au chien n°4, après l'intervention. Cette précaution sera dorénavant appliquée aux prochains chiens opérés.

Malgré des explications précises possibles, l'existence d'une insuffisance cardiaque gauche mais également droite très évoluée semble avoir une incidence sur la survenue de complications postopératoires. La marge de sécurité étant très diminuée sur ce type de candidats, il convient soit d'exclure les chiens présentant une atteinte globale sévère du prochain recrutement, soit de développer des méthodes d'implantation cellulaire moins invasives pour ces animaux.

Rapport-Gratuit.com

PERSPECTIVES

Ce travail sera poursuivi afin d'augmenter sensiblement le nombre de chiens opérés. Seule une série portant sur un plus grand nombre d'animaux, dans laquelle une analyse statistique montrera un gain fonctionnel, pourra servir de référence pré-clinique pour la transplantation de cellules chez l'homme insuffisant cardiaque. La publication de notes d'appel à participation dans la presse vétérinaire devrait nous permettre d'enrichir notre série dans un délai raisonnable.

Si les résultats bénéfiques observés ici étaient confirmés, un des aspects du travail sera d'élucider les mécanismes cellulaires, enzymatiques ou paracrines responsables de cette amélioration.

Une autre voie de recherche consistera également à comparer sur une autre série de chiens les avantages d'autres types cellulaires, et en particulier de cellules souches issues de la moelle osseuse. Les travaux de Tomita et al (1999), et de Makino et al (1999), en particulier sur la sélection de ces cellules et leur différenciation en cardiomyocytes sous l'action de divers agents *in vitro*, sont extrêmement encourageants. Tomita et al (1999) semblent avoir démontré leur bénéfice fonctionnel après transplantation. Cette stratégie apparaît comme une option compatible avec le cadre clinique de la médecine et de la chirurgie humaine

La thérapie génique appliquée aux atteintes cardiaques est un secteur en développement. Plusieurs essais *in vivo* sur des modèles expérimentaux ont été publiés, mais les taux d'incorporation des molécules thérapeutiques reste faible par l'injection intramyocardique de liposomes ou de virus. Des myoblastes transfectés ont déjà été utilisés en thérapie génique comme plates-formes de délivrance de molécules thérapeutique pour diverses maladies non cardiaque chez le chien (Ito *et al* (1998)). Cette stratégie pourrait être mise à profit dans l'insuffisance cardiaque, en apportant dans le myocarde par l'intermédiaire de myoblastes, des facteurs de différenciation cellulaire permettant, par exemple, l'entrée des cardiomyocytes (normalement irréversiblement différenciés) dans le cycle cellulaire, ou transformant les fibroblastes en cardiomyocytes, pour restituer une masse cardiaque contractile (« cardiomyoplastie moléculaire ») (Leor *et al* (1997)). Cette stratégie pourrait également être étudiée pour l'expression de récepteurs bêta-adrénergiques à la surface des cellules ou la synthèse *in situ* de facteurs de croissance (Leor *et al* (1997) et Nabel (1995)). Là encore, le modèle sur lequel nous travaillons permettrait l'évaluation et l'éventuelle validation d'une telle thérapie.

Une autre nécessité au cours de la continuation de ce travail sera de comparer les avantages et les éventuelles complémentarités de plusieurs techniques d'imagerie : échographie standard, échographie Color Kinesis, échographie Doppler tissulaire, scintigraphie, Tomographie par Emission de Positron, Imagerie par Résonance Magnétique (Skoufis et McGhie (1998)). Cette diversification permettra non seulement d'accumuler des données sur le retentissement de la cardiomyoplastie cellulaire, mais également de valider la meilleure technique d'exploration pour cette nouvelle thérapie. Un des axes de recherche dans cette comparaison sera de déterminer précisément les zones hypoperfusées, hypo- ou akinétiques, afin de pratiquer une cardiomyoplastie cellulaire 'sur mesure'.

Une évolution presque naturelle de la cardiomyoplastie cellulaire, qui ne consiste qu'en l'injection de cellules dans un organe, est l'orientation vers des techniques mini-invasives : mini-thoracotomie, thoracoscopie, techniques endomyocardiques. Ces techniques pourraient également marier une méthode d'exploration de la contraction segmentaire à un procédé d'injection. Par exemple, une sonde d'échographie DTI pourrait être couplée à un thoracoscope avec canal opérateur pour l'implantation cellulaire. Ce système permettrait de décider des meilleurs sites d'implantation et de guider l'opérateur pendant l'injection : respect de la vascularisation coronaire, concentration sur les zones hypokinétiques, implantation intrapariétale écho-guidée. Nous envisageons actuellement l'élaboration d'un tel procédé.

CONCLUSION

Ce travail de recherche a été réalisé dans un cadre vétérinaire et en collaboration avec une unité de recherche humaine. En effet, les deux parties trouvent des intérêts dans ce genre de collaboration : il existe un réel intérêt des modèles spontanés offerts par la médecine et la chirurgie vétérinaire mais les données recueillies peuvent servir à approfondir les connaissances scientifiques en recherche humaine.

Notre étude a été commencée en 1998. Plus d'une année a été nécessaire pour mettre en place l'organisation de notre travail et régler les problèmes techniques de base : depuis l'obtention et la culture des cellules satellites jusqu'à l'évaluation postopératoire des chiens greffés. Elle a déjà donnée lieu à une publication (Borenstein et Rajnoch (2002)).

Les résultats fonctionnels obtenus sur deux chiens sont très encourageants. La greffe de myoblastes chez ces deux animaux a permis d'obtenir une amélioration des paramètres cliniques et hémodynamiques. Ces résultats sont corroborés par une amélioration de la viabilité cellulaire et/ou de la vascularisation des zones greffées, ainsi que du comportement contractile intrapariétal du tissu myocardique proche de la normale. La série doit être poursuivie, afin d'enrichir et de confirmer ces résultats.

En plus de développer des techniques d'exploration fonctionnelle spécifiques et des méthodes mini-invasives pour l'acheminement des cellules satellites, il reste à conduire une recherche plus fondamentale sur la nature des interactions mécaniques, électriques, et paracrines entre les cellules greffées et le myocarde natif, expliquant ainsi l'amélioration fonctionnelle observée. Les myoblastes greffés ont-ils une activité contractile propre spontanée, ou est-elle déterminée par les cardiomyocytes natifs ? Agissent-ils en augmentant significativement le nombre de cellules contractiles ou jouent-ils un rôle comme plate-forme de signaux moléculaires envers leur micro-environnement ? Ou alors, contribuent-ils uniquement à éviter le remodelage ventriculaire ?

Après avoir répondu à ces questions et confirmé les résultats fonctionnels obtenus, la cardiomyoplastie cellulaire pourrait s'imposer comme une nouvelle alternative dans le traitement de la cardiomyopathie dilatée chez l'animal et mériterait d'être exploitée en médecine humaine, dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alamedine HS, Dehaupas M, Fardeau M (1989) Regeneration of skeletal muscle fibers from autologous satellite cells multiplied in vitro. An experimental model for testing cultured cell myogenicity. *Muscle Nerve*, **12**(7), 554-5.
- Bolling SF, Pagani FD, Deeb GM, Bach DS (1998) Intermediate-term outcome of mitral reconstruction in cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **115**, 381-8.
- Borenstein N, Rajnoch C (2002) Successful cellular cardiomyoplasty in canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg*. **74**, 298-9.
- Bosio P, Benacerraf S, Garot J, Garot P, Haziza F, Vermes E *et al* (1998) Stratégie thérapeutique de la prise en charge de l'insuffisance cardiaque aiguë. *Arch Mal Cœur*. **91**, 1349-58.
- Buchanan JW. Prevalence of cardiovascular disorders. In Fox PR, Sisson D, Moise NS (1999) *Textbook of canine and feline cardiology. Principles and clinical practice*. 2nd ed. Philadelphia : WB Saunders, 457-70.
- Carpentier A, Chachques JC (1985) Myocardial substitution with a simulated skeletal muscle : first successful clinical case. *Lancet*. **1**, 1267.
- Chachques JC, Abdel Shafy AB, Duarte F, Cattadori B, Goussef N, Shen L *et al* (2002) From dynamic to cellular cardiomyoplasty. *J Card Surg*. **17**, 194-200.
- Chachques JC, Berrebi A, Hernigou A, Cohen-Solat A, Lavergne T, Marino JP *et al* (1997) Study of muscular and ventricular function in dynamic cardiomyoplasty : a ten-year follow-up. *J Heart Lung Transplant*. **16**(8), 854-68.
- Chiu RCJ, Zibaitis A, Kao RL (1995) Cellular cardiomyoplasty : myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*. **60**, 12-8.
- Christlieb IY (1996) Cellular cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*. **61**, 772-3.
- Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A *et al* (1998) HL-1 cells : a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**(6), 2979-84
- Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC *et al* (1997) Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rats liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**(14), 7356-61.
- Dec GW, Fuster V (1994) Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. **331**(23), 1564-75.
- Delahaye F, de Gevigney G, Gaillard S, Cheneau E (1998) Epidémiologie et impact économique de l'insuffisance cardiaque en France. *Arch Mal Cœur*. **91**, 1307-14.
- Dengler TJ, Katus HA (2002) Stem cell therapy for the infarcted heart ("cellular cardiomyoplasty"). *Hertz*. **27**, 598-610.

Derumeaux G, Cochonneau O, Douillet R, Cribier A, Letac B (1997) Comparaison des velocities myocardiques par Doppler tissulaire chez les sujets normaux et dans les cardiomyopathies dilatées. *Arch Mal Cœur Vaiss.* **90**, 773-8.

Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, Pelletier MP, Shum-Tim D, Li C *et al* (1998) Myocardial Tissue engineering with autologous myoblast implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **116**, 744-51.

Dreyfus G (1998) Options chirurgicales alternatives à la transplantation cardiaque. *Arch Mal Cœur.* **91**, 1413-22.

Dreyfus G, Duboc D, Blasco A, Vigoni F, Dubois C, Brodaty D *et al* (1994) Myocardial viability assessment in ischemic cardiomyopathy : benefits of coronary revascularization. *Ann Thorac Surg.* **57**, 1402-8.

Gautron J. Culture de cellules musculaires squelettiques. In Adolphe M, Barlouatz G (1989) *Techniques en culture de cellules animales.* Paris : INSERM, 231-45.

Gorman RC, Gorman III JH (2002) Cellular myoplasty : What are we really trying to achieve? *J Thor Cardiovasc Surg.* **123**(3), 582-4.

Hagège A, Menasché P (2000) Cellular cardiomyoplasty : a new hope in heart failure. *Heart.* **84**, 465-6.

Hagège A, Scorsin M, Samuel JL, Rappaport L, Menasché P (1998) Cardiomyoplastie cellulaire – Etat des lieux, évaluation et avenir. *Arch Mal Coeur.* **91**, 1429-35.

Hutcheson KA, Zane Atkins B, Hueman MT, Benjamin Hopkins M, Glower DD, Taylor DA (2000) Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell transplantation.* **9**, 359-68.

Ito H, Vilquin JT, Skuk D, Roy B, Goulet M, Lille S *et al* (1998) Myoblast transplantation in non-dystrophic dog. *Neuromusc Disord.* **8**, 95-110.

Jia ZQ, Mickle DAG, Weisel RD, Mohabeer MK, Merante F, Rao V *et al* (1997) Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function. *Trans Proc.* **29**, 2093-4.

Kessler PD, Byrne BJ (1999) Myoblast cell grafting into heart muscle. *Annu Rev Physiol.* **61**, 219-42.

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest.* **98**, 216-24.

Koh GH, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ (1993) Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest.* **92**, 1548-54.

Koh GH, Soonpaa MH, Klug MG, Pride HP, Cooper BJ, Zipes DP *et al* (1995) Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *J Clin Invest.* **96**, 2034-42.

Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA (1996) Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium. *Circulation*. **94**(suppl II), II-332-II-336.

Leor J, Prentice H, Sartorelli V, Quinones MJ, Patterson M, Kedes LK *et al* (1997) Gene therapy and cell transplant : an experimental approach to repair a 'broken heart'. *Cardiovasc Res*

- Peshavaria M, Pang K (2000) Manipulation of pancreatic stem cells for cell replacement therapy. *Diabetes Technol Ther*, **2**(3), 453-60.
- Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO, Carpentier A (2001) Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **121**, 871-8.
- Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE (1999) Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts. *Circulation*. **100**, 193-202.
- Robinson SW, Cho PW, Levitsky HI, Olson JL, Hruban RH, Acker MA *et al* (1996) Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart : long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell transplant*. **5**(1), 77-91.
- Roell W, Fan Y, Xia Y, Stoecker E, Sasse P, Kolossov W *et al* (2002) Cellular cardiomyoplasty in a transgenic mouse model. *Transplantation*. **73**(3), 462-5.
- Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y *at al* (2002) Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation*. **105**, 2435-41.
- Schmidt HH, Tietge UJ, Manns MP (1997) Perspectives of liver cell transplantation : a review. *Hepato gastroenterology*, **44**(16), 1013-8.
- Scorsin M, Hagege AA, Dolizy I, Marotte F, Mirochnik N, Copin H *et al* (1998) Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure? *Circulation*. **98**(19 suppl), II151-5.
- Scorsin M, Hagege A, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M *et al* (1997) Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation*. **96**(suppl II), II-188-II-193.
- Skoufis E, McGhie AI (1998) Radionuclide techniques for the assessment of myocardial viability. *Tex Heart Inst J*. **25**, 272-9.
- Smith BF, Hoffman RK, Giger U, Wolfe JH (1990) Genes transferred by retroviral vectors into normal and mutant myoblasts in primary cultures are expressed in myotubes. *Mol Cell Biol*. **10**, 3268-71.
- Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ (1994) Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. **264**, 98-101.
- Steinhelper ME, Lanson NA, Dresdner KP, Delcarpio JB, Claycomb WC, Field LJ (1990) Proliferation in vivo and in culture of differentiated adult atrial cardiomyocytes from transgenic mice. *Am J Physiol*. **256**(6Pt2), H1826-34.
- Suzuki K, Murtuza B, Heslop L, Morgan JE, Smolenski RT, Suzuki N *et al* (2002) Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **123**(5), 984-91.

- Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP, Annex BH, Lilly RE, Glower DD *et al* (1997) Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbits heart by coronary infusion : a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Phys.* **109**(3), 245-53.
- Taylor DA, Zane Atkins B, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA *et al* (1998) Regenerating functional myocardium : improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* **4**(8), 929-34.
- Tidholm A, Haggstrom J, Jonsson L (1998) Prevalence of attenuated wavy fibers in muocardium of dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc.* **212**, 1732-4.
- Tidholm A, Jonsson L (1997) A retrospective study of canine cardiomyopathy (189 cases). *J Am Anim Hosp Assoc.* **33**(6), 544-50.
- Tidholm A, Svensson H, Sylven C (1997) Survival and prognostic factors in 189 dogs with dilated cardiomyopathy. *J Am Anim Hosp Assoc.* **33**(4), 364-8.
- Tidholm A, Haggstrom J, Borgarelli M, Tarducci A (2001) Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I : aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. *Vet J.* **162**(2), 92-107.
- Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T *et al* (1999) Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* **100**(19 suppl), II247-56.
- Van Meter CH, Claycomb WC, Delcarpio JB, Smith DM, deGruiter H, Smart F *et al* (1995) Myoblast transplantation in the porcine model : a potential technique for myocardial repair. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **110**, 1442-8.
- Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE (1981) Pathologic alterations in congestive cardiomyopathy of dogs. *Am J Vet Res.* **42**(3), 416-24.
- Vilquin JT, Scorsin M, Pouzet B, Hagège AA, Menasché P, Fiszman M *et al* (1999) Transplantations de cellules musculaires dans le myocarde. *Réal Cardiol.* **146**, 31-6.
- Watanabee E, Smith DM, Sun J, Smart FW, Delcarpio JB, Roberts TB *et al* (1998) Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Res Cardiol.* **93**(1), 30-7.
- White RN, Cobb MA, Brownlie SE, Pattison CN, Cumming DVE, Jones DGC *et al* (1997) Skeletal muscle extra-aortic countpulsation in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Smal Anim Pract.* **38**, 554-60.
- Whittemore SR, Snyder EY (1996) Physiological relevance and functional potential of central nervous system-derived cell lines. *Mol Neurobiol.* **12**(1), 13-38.
- Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ *et al* (2000) Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation.* **102**(19 suppl 3), III204-9.
- Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Li G, Yau TM (2000) Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Torac Surg.* **70**(3), 859-65.

Yoon PD, Kao RL, Magovern GJ (1995) Myocardial regeneration : transplanting satellite cells into damaged myocardium. *Tex Heart Inst J.* **22**, 119-25.

ANNEXES

Protocole chirurgical – Cardiomyopathie dilatée. Accord et responsabilités des propriétaires.

Cette feuille doit être attentivement lue par les propriétaires prêts à participer au protocole chirurgical pour leur chien atteint de cardiomyopathie dilatée. Elle a pour but de déterminer les responsabilités de chacun afin de permettre un bon travail d'équipe.

Responsabilité financière

Après une consultation initiale à la charge des propriétaires, le coût de l'ensemble des examens complémentaires est pris en charge par l'unité de Cardiologie d'Alfort (échocardiographie, ECG, pression artérielle, etc.). Les frais de bloc opératoire seront pris en charge par le service de Chirurgie pour les deux interventions. Les éventuelles consultations au service des Urgences restent à la charge des propriétaires.

Responsabilité et engagement moral des propriétaires

En contre partie de la gratuité des consultations de suivi et de tous les examens complémentaires, les propriétaires de chiens atteints de cardiomyopathie dilatée qui participent au protocole chirurgical s'engagent à deux choses :

Respecter les rendez vous de contrôle (une fois tous les 15 jours puis une fois par mois).
Lors d'un éventuel décès, permettre l'ouverture du thorax et le prélèvement du cœur pour étude.

Portée scientifique de l'étude

Ce nouveau protocole est le fruit d'une collaboration entre l'Unité de Cardiologie (Pr.Pouchelon) et le Service de Chirurgie (Pr. Fayolle) de l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort, ainsi que le Service de Chirurgie et Greffes Cardiaques de l'Hôpital Broussais à Paris (Pr. Carpentier). Des résultats de cette étude découlera peut être une nouvelle voie de traitement de la cardiomyopathie dilatée et plus généralement de l'insuffisance cardiaque chez le chien, mais également chez l'homme.

Signature du clinicien responsable

Signature du propriétaire
« lu et approuvé, bon pour accord »

Figure 21 : Feuille d'explication du protocole pour les propriétaires



Tableau IX: Liste des paramètres étudiés lors de la première consultation, en échocardiographie bidimensionnelle, temps-mouvement et Doppler

	<i>Abréviation</i>	<i>Définition</i>
MESURE 2D TM droit	SIVd mm	septum interventriculaire en diastole
	VGd mm	diamètre diastolique du ventricule gauche
	PPVGd mm	paroi postérieure du ventricule gauche en diastole
	SIVs mm	septum interventriculaire en systole
	VGs mm	diamètre systolique du ventricule gauche
	VolSystInd mL/m ²	Volume systolique indexé à la surface corporelle
	PPVGs mm	paroi postérieure du ventricule gauche en systole
	FE %	fraction d'éjection
	FR %	fraction de raccourcissement
	SIV %	pourcentage d'épaississement du septum interventriculaire
	PP %	pourcentage d'épaississement de la paroi postérieure du ventricule gauche
	VDd mm	diamètre diastolique du ventricule droit
	PVDs mm	paroi du ventricule droit en systole
	Ao mm	diamètre aortique
	AG mm	diamètre atrial gauche
	EAAO mm	excursion aortique antérieure
	OVA mm	ouverture de la boîte aortique
	AG/Ao	
	PEP ms	temps de pré-éjection
	TE ms	temps d'éjection
PEP/TE	temps de pré-éjection sur temps d'éjection	
ES	distance E. septum	
DOPPLER gauche	E mit m/s	vitesse maximale du flux transmitral au point E
	TD s	temps de décélération de E (3 mesures)
	A mit m/s	vitesse maximale du flux transmitral au point A
	E/A	
	Reflux mitral m/s	appréciation semi-quantitative au doppler couleur
	Reflux tricusp m/s:	appréciation semi-quantitative au doppler couleur
	VmaxCCVG m/s:	vitesse maximale dans la chambre de chasse ventriculaire gauche
	TaVmax s	temps d'accélération pour atteindre Vmax
VmaxCCVG/Ta	temps d'accélération sur Vmax	
AORTE	FVI m	intégrale de vitesse
	VmaxAo m/s	vitesse maximale dans l'aorte
	RR s	durée entre deux complexes
	FC bpm:	fréquence cardiaque
	DC l/m	débit cardiaque
	DC/poids	débit cardiaque/poids
DOPPLER droit	TP m/s	vitesse maximale du flux transpulmonaire
EPANCHEMENTS	EPPI	épanchement pleural
	EPP	épanchement péricardique
	VCC	dilatation de la veine cave caudale
	ASC	Ascite

CELLULAR CARDIOMYOPLASTY IN A CANINE MODEL OF IDIOPATHIC DILATED CARDIOMYOPATHY

SURNAME and given name : BEAUCOLIN Sandra

SUMMARY

The heart failure is one of the most mortal diseases in our society. Intensive researches were managed to try to debug techniques to regenerate myocardial tissue, palliative to cardiac transplantation. So, cellular cardiomyoplasty seems to be an interesting alternative which necessitated advanced clinical trials. We have done an experimental study on dogs suffering from dilated cardiomyopathy, to test this technique. The objectives were to debug manipulations to permit the elaboration of a myoblasts culture, then to determine the clinical and histological effects of the cellular transplant in the myocardium. **Material and methods** : The experimental protocol consist of a muscle sartorius biopsy, a cellular culture for two weeks, an intramyocardial graft, hemodynamic evaluations and myocardic evaluations with echography. Four dogs suffering from dilated cardiomyopathy were included in the study. Three techniques of primary culture were compared. The cellular implantation was done by thoracotomy and epicardic injections. **Results** : Muscles were healthy in these four animals. The culture done by monoenzymatique method (with collagenase) allowed to obtain more than 93 % of myoblasts. Two animals died during the postoperative period. Grafted cells were not found in the injections areas taken during the two autopsies. The two others dogs were examined during two and four months. A notable amelioration of clinical state, hemodynamic state, of thickness and parietal contractility as well as myocardic viability was noted in these animals. **Discussion** : If these ameliorations of functional parameters are confirmed in some few other cases, these preclinical results would validate myocardial graft of satellite cells as a new alternative as a treatment of dog with dilated cardiomyopathy and so human cardiac failure.

Key words : cellular cardiomyoplasty, dilated cardiomyopathy, heart failure, animal experimentation, animal model, dog

JURY

President :

Director : Pr. POUCHELON

Assessor : Pr. MOISSONNIER

Guest : Dr. BORENSTEIN

Author's address :

BEAUCOLIN S. – 7 rue Edouard Manet – 92500 RUEIL MALMAISON

CARDIOMYOPLASTIE CELLULAIRE SUR UN MODELE CANIN DE CARDIOMYOPATHIE DILATEE IDIOPATHIQUE

NOM et Prénom : BEUCOLIN Sandra

RESUME

L'insuffisance cardiaque est l'une des maladies les plus mortelles de notre société. La recherche s'est intéressée récemment à la mise au point de techniques de régénération du tissu myocardique, alternatives à la transplantation cardiaque. Ainsi, la cardiomyoplastie cellulaire s'est révélée une technique encourageante nécessitant des essais cliniques avancés. Nous avons donc mené une étude sur des chiens atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique. Les objectifs de cette étude étaient d'obtenir une culture de myoblastes et de déterminer les effets, aussi bien cliniques qu'histologiques, de l'autogreffe cellulaire au sein du myocarde. **Matériel et méthodes** : Le protocole expérimental comportait une biopsie du muscle sartorius, une culture cellulaire de deux semaines, une implantation intramyocardique, des évaluations hémodynamiques et des évaluations de la viabilité myocardique par échographie. Quatre chiens atteints de cardiomyopathie dilatée ont été inclus. Trois techniques de culture primaire ont été comparées. L'implantation cellulaire s'est faite par thoracotomie et injections épiscopardiques. **Résultats** : Les muscles étaient sains chez ces quatre animaux. La culture par méthode monoenzymatique à la collagénase a permis l'obtention de plus de 93 % de myoblastes. Deux animaux sont morts pendant la période postopératoire. Les cellules greffées n'ont pas été retrouvées dans les zones d'injection prélevées lors des deux autopsies. Les deux autres chiens ont été suivis respectivement pendant 2 et 4 mois. Une amélioration notable du statut clinique, hémodynamique, de l'épaisseur et de la contraction pariétale ainsi que de la viabilité myocardique a été notée chez ces. **Discussion** : Si cette amélioration remarquable des paramètres fonctionnels était confirmée sur une série sensiblement augmentée, ces résultats pré-cliniques valideraient alors l'implantation myocardique de cellules satellites comme une nouvelle alternative pour le traitement d'animaux atteints de CMD mais pourrait également être exploité dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chez l'homme.

Mots clés : cardiomyoplastie cellulaire, cardiomyopathie dilatée, insuffisance cardiaque, expérimentation animale, modèle animal, chien

JURY

Président :

Directeur : Pr. POUCHELON

Assesseur : Pr. MOISSONNIER

Invité : Dr. BORENSTEIN

Adresse de l'auteur :

BEUCOLIN S. – 7 rue Edouard Manet – 92500 RUEIL MALMAISON