

Université de Sherbrooke

Marqueurs de cardioprotection associée à la répression de la protéase mastocytaire de type 4 chez la souris

Par

Hanène Touil

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine et des Sciences de la santé, Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Octobre, 2018

Membres du jury d'évaluation

Dr Pedro D'Orléans-Juste, Département de pharmacologie et physiologie
Dr Ghassan Bkaily, Département d'anatomie et biologie cellulaire
Dr Mannix-Auger-Messier, programme de pharmacologie et physiologie
Dr Paul Farand, Département de Médecine, service de cardiologie

©Hanène Touil, 2018

[Dédicace]

À mes professeurs Pedro D'Orléans-Juste et Ghassan Bkaily,

Je vous remercie d'avoir cru en moi et m'avoir offert cette opportunité de pratiquer de la recherche et finaliser ma maîtrise.

À mon professeur Pedro,

Je vous remercie d'abord pour votre confiance en moi et votre accueil. Vous avez guidé ma démarche scientifique pour accomplir ce travail. Merci pour votre disponibilité, votre temps, votre écoute et vos conseils précieux qui ont éclairé mon parcours scientifique durant les années de ma maîtrise. Merci pour votre compréhension, votre compassion, votre disposition à discuter même de mes problèmes personnels et de m'avoir accommodé au cours de la maladie de ma fille. Je vous en suis reconnaissante. Je sens que les mots ne me suffisent pas pour vous remercier...

À notre technicienne Angèle Tremblay,

Grâce à votre aide, j'ai pu continuer à travailler sur le projet d'infarctus du myocarde chez la souris. Merci pour votre patience et votre acharnement pour m'enseigner la technique chirurgicale.

À mes collègues,

Louisane Desbiens, tu as été mon enseignante à chaque nouvel apprentissage dans ce laboratoire. Tu m'as appris les ABC. Avec tes conseils, ton temps sacrifié pour des démonstrations, ta disponibilité et ton écoute, j'ai pu avancer et atteindre mes objectifs.

Laurence Vincent, depuis que tu as commencé ta maîtrise parmi nous, une belle nouvelle ambiance a régné dans le laboratoire. Le travail est un plaisir c'est ce que tu m'as prouvé! Je te remercie pour ton aide précieuse pour certains de mes résultats.

Martin Houde, merci de ton aide au début de mon parcours, pour tes conseils précieux et ta gentillesse.

Modou Lo, je te remercie de m'avoir enseigné certaines pratiques au laboratoire.

Catherine Lapointe, ton énergie et ton amour du travail sont inspirants. Je te remercie pour ton aide.

À la personne la plus chère au monde,

Maman, les distances n'ont jamais été un obstacle pour ton amour intarissable, ton optimisme, tes conseils qui ont toujours guidé mon chemin, ton encouragement pour avancer et accomplir mes objectifs académiques. Aucune expression ne saurait suffire pour t'exprimer le degré de profondeur de mes sentiments, tu n'as cessé de me soutenir tu as toujours été présente à mes côtés. Je te dois ce que je suis aujourd'hui.

Que le tout puissant puisse te donner santé, bonheur et longue vie pour me permettre de te rendre le peu de ce que tu as fait pour moi!

À mon cher père,

Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta compréhension et ton encouragement m'ont été le soutien pour avancer.

À mon mari Moez,

C'est grâce à ton aide et à ton encouragement que je suis arrivée à achever mes rêves. Je te remercie.

À mes enfants Jouri, Cyrine et Mohamed Rayène,

Je m'excuse pour tout le temps où j'ai manqué de disponibilité pour être ensemble. Vous embellissez ma vie! Je vous adore! Je vous promets de faire de mon mieux pour être le bon exemple pour vous. Je vous souhaite un bon parcours sur le chemin de la vie!

REMERCIEMENTS

Je remercie les professeurs Paul Farand, Mannix Auger-Messier, Pedro D'Orléans-Juste, et Ghassan Bkaily d'avoir accepté de corriger mon mémoire.

[Épigraphe]

« Le temps de la réflexion est une économie de temps. »

Publius Syrus

RÉSUMÉ

Marqueurs de cardioprotection associée à la répression de la protéase mastocytaire de type 4 chez la souris

Par

Hanène Touil

Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La protéase mastocytaire murine de type 4 ou *mMCP-4*, l'isoforme de la chymase humaine est une enzyme présente dans les mastocytes du tissu conjonctif. Plusieurs études ont démontré le rôle délétère de cette enzyme dans le développement de plusieurs pathologies cardiovasculaires. Par le biais d'un modèle de souris réprimée pour la *mMCP-4*, et suite à un infarctus du myocarde permanent, les marqueurs relatifs au rôle délétère de la chymase pourraient être mis en évidence. Le but de cette étude est d'identifier le rôle modulateur de la chymase au niveau des facteurs cardiaques dans l'infarctus du myocarde chez la souris.

Notre objectif est de tester l'hypothèse que la *mMCP-4* module l'apparition de marqueurs cardiaques et systémiques associés à l'infarctus du myocarde permanent dans le modèle de souris.

Nos résultats montrent qu'en post-infarctus, la survie à 7 jours des souris *mMCP-4KO* est augmentée (85%) comparée à leurs congénères sauvages (47%). La principale cause de mortalité a été la rupture cardiaque à partir du 4^{ème} jour post-infarctus. Le BNP plasmatique n'a pas permis de corrélérer la gravité de l'infarctus du myocarde (IDM) à une souche de souris permettant de l'identifier à plus haut risque de morbi-mortalité. La zone péri-infarctie cardiaque est le siège d'une invasion mastocytaire vers le 7^{ème} jour post-IDM de façon plus importante dans la souche *WT* comparée à sa congénère *KO*. Un dépôt de collagène a été mis en évidence à partir du jour 3 post-infarctus. Sa densité est plus prononcée au niveau de la zone infarctie à 7 jours au niveau des cœurs *KO* comparés aux *WT*, ce qui expliquerait la réduction de l'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche plus importante dans les cœurs de souris *WT* à 7 jours comparées aux *KO*. L'apoptose a été plus marquée au niveau de la zone infarctie des cœurs de souris *WT* à 3 jours post-infarctus comparé aux *KO* et aux *WT* 1 et 7 jours. Une dégranulation mastocytaire importante est observée à 1 jour post-IDM dans les souris *WT* traduite par la perte de l'activité chymasique des mastocytes péritonéaux. Le niveau d'expression relative des récepteurs à l'endothéline-1 (ET-1) voit sa valeur augmenter de façon significative au niveau des poumons des souris *WT*, tandis que les niveaux d'expression ne varient pas dans les poumons de souris *KO*.

En conclusion, dans notre modèle de souris réprimé en *mMCP-4* une cardioprotection a été observée, associée au remodelage tissulaire myocardique plus favorable et moins d'apoptose, un risque de rupture plus faible et à l'absence d'impact sur le niveau d'expression des récepteurs à l'ET-1 au niveau pulmonaire.

Mots clés : Chymase, Infarctus du Myocarde, Mastocytes, Apoptose, Collagène, Activité Enzymatique.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. Infarctus du myocarde	1
1. Épidémiologie.....	1
2. Étiologies.....	2
3. Facteurs de risque.....	2
4. Complications.....	2
5. Traitement	3
6. Avancées thérapeutiques en recherche:	3
a. <i>Bases d'études</i>	3
b. <i>Principe de lésion de reperfusion et les moyens thérapeutiques proposés</i>	3
c. <i>Rôle de l'inflammation dans l'infarctus du myocarde</i>	4
e. <i>Modèles animaux</i>	5
II. Implication des mastocytes dans l'infarctus du myocarde	5
1. Mastocytes	6
2. Réaction inflammatoire mastocytes-dépendante au cours de l'infarctus du myocarde....	7
III. Rôle des mastocytes dans le développement de la fibrose post-IDM.....	9
IV. Rôle de la chymase mastocytaire au cours de l'infarctus du myocarde	11
1. La chymase	11
2. Effets biologiques de la chymase	11
3. Chymase et infarctus du myocarde	12
4. Mort cellulaire au cours de l'IDM	13
V. Peptide natriurétique cérébral	16
VI. L'endothéline-1.....	16
VII. Récepteurs à l'endothéline	18

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Animaux.....	22
II. Induction de l'infarctus du myocarde	22

III. Analyse de survie Kaplan-Meier	26
IV. Prélèvement sanguin.....	26
V. Protocole d'extraction des mastocytes péritonéaux.....	26
VI. Activité de type chymotrypsine des mastocytes in vitro.....	27
VII. ELISA BNP	28
VIII. EXTRACTION D'ARN ET qPCR.....	28
IX. Histologie	30
1. Coloration au Bleu de Toluidine	30
2. Coloration au <i>Picro Sirius Red</i>	30
X. ÉPAISSEUR MINIMALE DU VENTRICULE GAUCHE.....	30
XI. IMMUNOHISTOCHIMIE	31
XII. QUANTIFICATION	31
XIII. TESTS STATISTIQUES	31

RÉSULTATS

I. Analyse de survie Kaplan-Meier	32
1. Courbe de survie.....	32
2. Causes de mortalité	32
3. Variation du poids du cœur post-infarctus	35
4. Variation du poids des poumons post-infarctus	35
II. Dosage du BNP plasmatique.....	37
III. Quantification de l'invasion mastocytaire cardiaque.....	39
1. Aspect microscopique des mastocytes cardiaques	39
2. Aspect et quantification des mastocytes au niveau des coupes cardiaques colorées au bleu de Toluidine.....	40
IV. Quantification de la fibrose myocardique post- infarctus.....	44
1. Aspect microscopique de la fibrose myocardique :.....	44
2. Aspect macroscopique des coupes des cœurs colorées au <i>Picro Sirius Red et quantification du collagène</i>	45
V. Étude de l'apoptose au niveau des coupes de cœurs infarcis.....	48
1. Aspect microscopique des cellules apoptotiques au niveau du myocarde :	48

2.	Aspect macroscopique des coupes de cœurs marqués à l'anticorps anti-caspase-3 active et quantification de l'apoptose.....	49
VI.	Étude de l'épaisseur minimale de la paroi cardiaque ventriculaire gauche.....	51
VII.	Étude des mastocytes péritonéaux	52
1.	Décompte mastocytaire	52
2.	Activité enzymatique	54
a.	<i>Souris WT</i> :.....	54
b.	<i>Souris mMCP-4KO</i>	56
VIII.	Étude de l'expression des récepteurs à l'endothéline dans les poumons de souris	57
1.	Récepteur ET _A	57
a.	<i>Souris WT</i>	57
b.	<i>Souris mMCP-4KO</i>	57
2.	Récepteur ET _B	57
a.	<i>Souris WT</i>	57
b.	<i>Souris mMCP-4KO</i>	58

DISCUSSION

I.	Validation ou invalidation de l'hypothèse principale.....	59
II.	Amélioration de la survie des souris infarctées réprimées en <i>mMCP-4</i>	60
III.	Moins d'apoptose myocardique associée à la répression de la <i>mMCP-4</i>	61
IV.	La répression de la chymase aide à un remodelage cardiaque favorable	62
1.	L'invasion mastocytaire	62
2.	Fibrose myocardique	64
V.	Le BNP : facteur pronostic <i>mMCP-4</i> indépendant.....	66
VI.	Participation de la chymase dans la synthèse d'ET-1	66
VII.	La <i>mMCP-4</i> MODULE LES niveaux d'expression des récepteurs de l'endothéline-1 au niveau pulmonaire	69
VIII.	Récapitulation des RÉSULTATS RAPPORTÉS dans l'étude	71
IX.	Limites de l'étude.....	72
X.	Perspectives	72
1.	Étude cellulaire cardiaque post-IDM.....	72

2.	Étude des mastocytes pulmonaires	72
3.	Étude des mastocytes péritonéaux	72
4.	Étude hémodynamique.....	73
5.	Étude du remodelage pulmonaire.....	73
6.	Effets de la chymase sexe-dépendant?	73
7.	Vers une avancée thérapeutique chez l'Homme.....	73
XI.	CONCLUSIONS GÉNÉRALES	73
	RÉFÉRENCES	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Mastocytes humains issus de la moelle osseuse colorés au May Grünwald/Giemsa.....	7
Figure 2: Quelques médiateurs mastocytaires et leurs effets au cours de l'infarctus du myocarde.....	8
Figure 3: Rôle de la chymase dans le remodelage cardiaque.....	10
Figure 4: Diagramme représentatif de l'effet de l'inhibition de la chymase sur la protection myocardique et la fibrose.....	15
Figure 5: Mécanismes de mort cellulaire.....	15
Figure 6: Représentation schématique du clivage de la Big Endothéline-1 par l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 et la chymase pour produire l'endothéline-1 et l'endothéline-1 (1-31).....	18
Figure 7: Technique de ligature de l'artère coronaire descendante antérieure gauche.....	25
Figure 8: Analyse de survie Kaplan-Meier sur 7 jours à la suite de la ligature de l'artère coronaire descendante antérieure gauche.....	33
Figure 9: Mortalité au cours de la période de suivi.....	34
Figure 10: Variation des poids du coeur et des poumons en post IDM	36
Figure 11: Quantification du taux de BNP plasmatique	38
Figure 12: Mastocytes au niveau du tissu cardiaque coloré au bleu de Toluidine.....	39
Figure 13: Aspect macroscopique des coupes de coeurs de souris shams et infarcies de 1, 3 et 7 jours colorés au bleu de Toluidine.....	42
Figure 14: Quantification des mastocytes cardiaques en post IDM.....	43
Figure 15: Travées de collagène, sur une coupe de coeur de souris infarcie <i>WT</i>	44
Figure 16: Aspect macroscopique des coupes de coeurs infarcis et shams à 1, 3 et 7 jours post opératoires colorés au Picro Sirius Red.....	46
Figure 17: Quantification du collagène au niveau de la portion apicale de la coupe transversale de coeurs infarcis, résultat corrigé par rapport aux shams.....	47
Figure 18: Aspect microscopique des cellules apoptotiques marquées en brun par un anticorps anti caspase 3 active.....	48

Figure 19: Aspect macroscopique des coupes de cœurs infarcis et shams de 1, 3 et 7 jours marquées à l'anticorps anti caspase-3 active montrant les zones apoptotiques en brun.....	50
Figure 20: Quantification de l'apoptose au niveau de la portion apicale de la section transversale de coupes cardiaques de souris infarcis de 1, 3 et 7 jours.....	51
Figure 21: Étude de l'épaisseur minimale de la paroi cardiaque ventriculaire gauche de souris infarcies <i>WT</i> et <i>KO</i> de 1, 3 et 7 jours	52
Figure 22: Décompte des mastocytes péritonéaux recueillis par lavage péritonéal chez les souris <i>WT</i> et <i>mMCP-4KO</i> à la suite de chirurgies shams et infarcies de 1, 3 et 7 jours.....	54
Figure 23: Variation de la cinétique de l'activité chymase des mastocytes péritonéaux en présence d'un substrat fluorogénique chez les souris <i>WT</i> sham et infarcies à 1, 3 et 7 jours post opératoires.....	56
Figure 24: Variation de la cinétique de l'activité chymase des mastocytes péritonéaux en présence d'un substrat fluorogénique chez les souris <i>KO</i> sham et infarcies à 1, 3 et 7 jours post opératoires.....	55
Figure 25: Variation du niveau d'expression relative des récepteurs à l'endothéline au niveau du lobe pulmonaire supérieur gauche de souris infarcies comparées aux shams.....	59
Figure 26: Schéma récapitulatif des conséquences d'un infarctus du myocardique chez la souris <i>WT</i> vs <i>mMCP-4KO</i> , à l'échelle locale et à distance du cœur, observées au cours de notre étude.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Paramètres du respirateur en fonction du poids de la souris.....	24
Tableau 2: Présentation simplifiée de la surveillance et des dates de prélèvement des souris opérées sham et infarciées, <i>WT</i> et <i>mMCP-4KO</i>	25
Tableau 3: Amorces et conditions de la qPCR des récepteurs à l'endothéline-1	29

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BNP : Peptide natriurétique cérébral

C57Bl/6J: Souris C57 noire 6 J

DAMPs: Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires

ET-1 : Endothéline-1

ET_A : Récepteur A de l'endothéline

ET_B : Récepteur B de l'endothéline

FcεR1 : Récepteur Fc epsilon-1

IDM: Infarctus du myocarde

IGF-1 : Facteur de croissance similaire à l'insuline

IL-1 : Interleukine-1

KO : *mMCP-4KO*

LAD : Left anterior descending coronary: coronaire antérieure descendante gauche

Min: Minute

mMCP-4KO: Protéase mastocytaire murine de type 4

MMP-9 : Métalloprotéinase matricielle-9

RT-qPCR : PCR quantitatif après transcription inverse (*reverse-transcription quantitative PCR*)

TGFβ: Facteur de croissance transformant de type β

TLR : Récepteur similaire à Toll

TNFα: Facteur nécrosant tumoral α

TUNEL : dUTP terminal médié par la deoxynucleotidyl transférase terminale

UAF : Unité arbitraire de fluorescence

WT: *Wild type* (type sauvage)

INTRODUCTION

Toutes les maladies cardiovasculaires et en particulier l'infarctus du myocarde sont des causes majeures de morbidité et de mortalité à travers le monde (Benjamin *et al.*, 2018). Plusieurs études ont été consacrées à une meilleure compréhension des aspects étiologiques et des différents mécanismes sous-jacents grâce à des modèles animaux. Le rôle de la chymase dérivée des mastocytes dans l'étiologie de l'infarctus du myocarde suscite beaucoup d'intérêt actuellement (S. Doggrell, 2004; Jin *et al.*, 2002; Kanemitsu *et al.*, 2006; Oyamada *et al.*, 2011; Takai *et al.*, 2004; Tejada *et al.*, 2016, p. 1). Plusieurs études ont démontré le rôle protecteur de la stabilisation mastocytaire (Bot *et al.*, 2008) et de l'inhibition pharmacologique de la chymase dont les conséquences ont été une amélioration de la fonction cardiaque et l'augmentation de survie (Jin *et al.*, 2003, 2002; Oyamada *et al.*, 2011; Takai *et al.*, 2004). De même et d'après une publication récente de notre laboratoire, le rôle cardioprotecteur de la répression génique de la protéase mastocytaire murine de type 4, l'homologue de la chymase humaine, a été expérimentalement validé (Houde *et al.*, 2018). Dans le présent ouvrage, nous avons étudié l'impact de la *mMCP-4* sur l'expression de différents marqueurs dans un modèle expérimental d'infarctus du myocarde.

I. INFARCTUS DU MYOCARDE

1. ÉPIDÉMIOLOGIE

La pathologie coronarienne, et particulièrement l'infarctus du myocarde, est une des causes principales de mortalité en Amérique du Nord et à travers le monde. En effet, d'après les dernières statistiques de l'Association Américaine de Cardiologie, entre 2011 et 2014, environ 7.9 millions (3.0%) d'américains âgés de 20 ans et plus ont eu un infarctus du myocarde (IDM). La répartition selon le sexe est de 3.8% chez l'homme et de 2.3% chez la femme. La probabilité de survenue d'une insuffisance cardiaque post-ischémique après l'âge de 45 ans, dans les 5 ans suivants, est de 16% chez l'homme et de 22% chez la femme. La fréquence de récurrence d'un 2^{-ème} IDM pouvant être fatal après l'âge de 45 ans, dans les 5 ans suivants, est de 17% chez l'homme et de 21% chez la femme. La survie moyenne en

années après un 1^{er} IDM, dans la même tranche d'âge est de 8.2 chez l'homme et de 5.5 chez la femme (Benjamin *et al.*, 2018).

2. ÉTIOLOGIES

Un IDM survient quand la perfusion sanguine myocardique est réduite causant la nécrose cellulaire. Elle est due principalement à la formation d'un thrombus au niveau d'une artère coronaire. La fissuration ou la rupture d'une plaque d'athérome entraîne l'exposition de lipides pro-thrombotiques à la circulation sanguine ce qui active la cascade de coagulation et la formation de thrombus qui obture subséquentement, partiellement ou entièrement la lumière coronarienne. D'autres causes toutefois plus rares incluent une embolie coronarienne secondaire à des végétations valvulaires ou un thrombus intraventriculaire, l'utilisation de cocaïne, une dissection coronarienne, une hypotension systémique morbide ou une anémie (Boateng and Sanborn, 2013).

3. FACTEURS DE RISQUE

Plusieurs facteurs prédisposent à cette coronaropathie. Les antécédents familiaux d'IDM, le sexe masculin, le sexe féminin en post-ménopause et l'âge avancé constituent les facteurs de risque non-modifiables. Le deuxième groupe de facteurs de risque modifiables incluent le tabagisme, l'alcoolisme, le diabète, la dyslipidémie, l'hypertension artérielle, l'obésité, la sédentarité, et une diète alimentaire déséquilibrée (Benjamin *et al.*, 2018; Boateng and Sanborn, 2013).

4. COMPLICATIONS

Les troubles du rythme cardiaque et les anomalies de conduction comptent parmi les complications les plus fréquentes de l'infarctus (90% des patients atteints d'infarctus du myocarde). Ces troubles augmentent le risque de mortalité au cours des 3 premiers jours post-infarctus. L'état de choc cardiogénique survient dans 7% des cas d'IDM causant une mortalité de 80-90% en absence de traitement. Les complications mécaniques sont : la rupture du muscle papillaire, l'anévrisme ventriculaire, rupture septale, la rupture de la paroi libre ventriculaire souvent fatale (Boateng and Sanborn, 2013). En effet, plusieurs mécanismes, telles que l'apoptose, un remodelage cardiaque inadéquat et les forces

d'étirement exercées sur une paroi ventriculaire infarctée et structurellement affaiblie, peuvent expliquer la rupture cardiaque (Wehrens and Doevendans, 2004).

5. TRAITEMENT

Le but principal du traitement initial est de restaurer rapidement la circulation vasculaire (reperfusion grâce à une fibrinolyse et/ou une angioplastie transcutanée), contrôler l'instabilité hémodynamique et soulager la douleur (morphine, dérivés nitrés). Un traitement adjuvant à base d'antiagrégant plaquettaire (aspirine, clopidogrel, antagoniste de la glycoprotéine IIb/IIIa), de bêta bloquant, d'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, de statine, ou de traitement anticoagulant (héparine) est aussi recommandé (Boateng and Sanborn, 2013; Ibanez *et al.*, 2018; Reed *et al.*, 2017).

6. AVANCÉES THÉRAPEUTIQUES EN RECHERCHE:

a. Bases d'études

Malgré les avancées majeures, la pathologie cardiaque ischémique demeure encore une cause importante de morbidité et de mortalité. Actuellement, les principaux buts thérapeutiques de la cardiologie moderne sont de trouver des stratégies qui visent la réduction de la lésion nécrotique cardiaque et d'optimiser la réparation tissulaire myocardique (Frangogiannis, 2002).

b. Principe de lésion de reperfusion et les moyens thérapeutiques proposés

Plusieurs études se sont concentrées sur des approches pouvant être cardioprotectrices, en plus du traitement conventionnel, surtout après la découverte des dommages liés à la lésion de reperfusion à la suite du rétablissement de la circulation coronarienne. Cette lésion englobe l'atteinte et la mort des cardiomyocytes vulnérables due à l'altération du fonctionnement mitochondrial qui joue un rôle central dans la surproduction de radicaux libres d'oxygène et l'altération du transport de calcium. Ce dysfonctionnement mitochondrial aboutit à une altération du métabolisme myocardique, microvasculaire et endothélial.

Ce concept permet d'ajouter un nouvel objectif dans la conduite thérapeutique. En plus de rétablir la circulation coronarienne qui est la pierre angulaire du traitement, une

cardioprotection s'avère primordiale pour limiter la lésion myocardique et faciliter le rétablissement de cet organe vital.

Plusieurs moyens (en cours d'essai) visant à limiter l'effet de la lésion de reperfusion sur le cœur chez l'homme ont été étudiés : moyens mécaniques (pré-et post-conditionnement ischémique), pharmacologiques (cyclosporine A, exenatide, adénosine, peptide atrial natriurétique, etc.), thérapies régénératives (cellules souches) et des stratégies métaboliques (refroidissement, hyperoxémie) (Spath *et al.*, 2016).

c. Rôle de l'inflammation dans l'infarctus du myocarde

L'IDM est associé à une réaction inflammatoire. Elle est plus accentuée et accélérée en cas de reperfusion coronarienne. Des études ont proposé d'inhiber cette réaction pour limiter la taille de l'infarctus à travers un modèle d'ischémie-reperfusion chez le chien. En revanche, l'utilisation de corticostéroïdes chez l'homme à la suite d'un IDM a ralenti la réaction inflammatoire et le processus de cicatrisation et a abouti à des complications majeures (arythmies et extension de l'infarctus). En effet, les anti-inflammatoires stéroïdiens diminuent l'infiltration cardiaque par des cellules inflammatoires et retardent le dépôt de collagène et la cicatrisation. Cette observation a démontré le rôle primordial du phénomène inflammatoire dans la réparation tissulaire à travers le recrutement de cellules inflammatoires responsables de la réparation tissulaire (Frangogiannis, 2002).

La réparation tissulaire à la suite de l'infarctus du myocarde est biphasique; une phase d'inflammation aiguë (3-4 jours) durant laquelle il y a un recrutement de cellules immunitaires et une digestion tissulaire de la zone infarctée. Cette phase est suivie d'une phase proliférative et réparatrice (au-delà de 4 jours) : résolution de l'inflammation, néovascularisation et formation de la cicatrice (Prabhu and Frangogiannis, 2016)

d. Origine de la réaction inflammatoire en post-infarctus

Au cours de l'IDM, les cardiomyocytes nécrotiques constituent le principal stimulus de la réaction inflammatoire post-IDM à travers la libération de motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs). Les cardiomyocytes au niveau de la zone péri-infarctée déclenchent la réaction inflammatoire via la synthèse et la libération de cytokines en réponse à l'interleukine-1 (IL-1), aux ligands de TLR et aux espèces réactives de l'oxygène. De

même, les fibroblastes stimulés par les DAMPS, les radicaux libres de l'oxygène et l'IL-1, secrètent des cytokines et des chémokines (Prabhu and Frangogiannis, 2016).

e. Modèles animaux

La découverte et le développement des différentes approches cardioprotectrices nécessitent une meilleure connaissance de la pathogénèse et des mécanismes complexes (moléculaires et cellulaires) sous-jacents à l'IDM. Plusieurs modèles animaux ont été conçus pour aider à la compréhension de cette maladie. Le choix du modèle animal est basé sur le coût faible, la facilité de manipulation, la reproductibilité, physiologiquement représentatif de la pathologie humaine et éthiquement accepté. En effet, la souris a été le modèle de choix durant les 2 dernières décennies du fait qu'on trouve, dans son patrimoine génétique, les orthologues de 99% des gènes humains. En outre, cet animal est facilement modifiable génétiquement. En plus, leur durée de vie est courte permettant de voir l'histoire naturelle de la maladie raccourcie (Camacho *et al.*, 2016). De plus, les souches de souris transgéniques constituent un moyen expérimental puissant pour l'étude des effets spécifiques des produits des gènes modifiés permettant de mieux comprendre leur rôle mécanistique dans le développement d'une pathologie donnée (Patten *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'induction d'un IDM irréversible chez la souris est l'un des modèles les plus fréquemment utilisés pour mimer cette pathologie chez l'homme à travers la ligature permanente de l'artère coronaire descendante antérieure gauche (Camacho *et al.*, 2016). En effet, avec une ligature permanente, nous étudions les conséquences inhérentes à l'infarctus du myocarde en dehors d'une lésion de reperfusion observée dans le modèle d'ischémie /reperfusion.

II. IMPLICATION DES MASTOCYTES DANS L'INFARCTUS DU MYOCARDE

L'étude d'explants cardiaques humains et de cœurs issus de modèles animaux d'infarctus du myocarde a attiré l'attention des chercheurs vers des observations pouvant mener à l'explication de certains phénomènes physiopathologiques au cours du développement de l'IDM. Un intérêt particulier a été accordé à la présence d'un nombre anormalement élevé de mastocytes au niveau du tissu myocardique. Ces cellules jouent un rôle central dans la fibrose tissulaire et le remodelage myocardique (Batlle *et al.*, 2007).

À travers la libération de cytokines, de facteurs de croissance nécessaires pour la prolifération des fibroblastes et la néovascularisation, les mastocytes sont considérés comme un chef d'orchestre de la réaction inflammatoire post-IDM aboutissant à la réparation tissulaire et la cicatrisation (Frangogiannis, 2002).

1. MASTOCYTES

Les mastocytes sont des cellules caractérisées par un noyau monolobulaire avec de nombreux granules cytoplasmiques (**figure 1**). Les mastocytes dérivent des cellules souches hématopoïétiques siégeant au niveau de la moelle osseuse. Les cellules progénitrices des mastocytes sont libérées au niveau de la circulation sanguine. Sous l'influence de cytokines et de chémokines, ces cellules atteignent les tissus et se différencient en mastocytes matures de type mastocyte des tissus conjonctifs ou des surfaces muqueuses. Les mastocytes résidents exercent leurs effets à la suite de leur stimulation par des cytokines, des anticorps et des protéines spécifiques à leurs récepteurs membranaires : l'Immunoglobuline E qui active le récepteur Fc epsilon-1 (FcεR1), l'Immunoglobuline G, le système du complément, les peptides pathogéniques agissant sur le récepteur similaire à Toll, les ligands endogènes comme la substance P et l'endothéline-1 (ET-1) (Kritikou *et al.*, 2016).

Le contenu granulaire des mastocytes est constitué de plusieurs molécules comme les protéoglycanes (héparine, chondroïtine sulfate), l'histamine, les cystéinyl cathepsines, les protéases (tryptase, chymase) et une variété de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Le mastocyte est capable d'agir sur les cellules adjacentes et sur le microenvironnement local à travers leurs médiateurs libérés après dégranulation (Kritikou *et al.*, 2016).

Les mastocytes siègent principalement au niveau des tissus épithéliaux et muqueux. Chez les rongeurs, ils sont localisés au niveau des cavités thoracique et péritonéale. Ils existent au niveau des tissus vascularisés à l'exception du système nerveux central et de la rétine. Ils sont principalement concentrés au niveau des zones exposées au milieu extérieur en contact avec des antigènes telles que le tractus gastro-intestinal, l'épithélium respiratoire, et la peau (Krystal-Whittemore *et al.*, 2016).

Au niveau du système cardiovasculaire, les mastocytes sont localisés au niveau périvasculaire et au niveau du cœur chez l'homme et chez la souris. À l'état physiologique,

le mastocyte joue un rôle dans l'angiogenèse et la génération locale d'angiotensine II. La majorité des mastocytes cardiaques, qui sont des mastocytes du tissu conjonctif, contiennent dans leurs granules l'héparine, la chymase et la tryptase en plus de plusieurs médiateurs qui participent aux phénomènes observés en pathologie cardiovasculaire (le facteur de croissance transformant β ou TGF β , l'interleukine-8 ou IL-8, protéine 1 chémotactique des monocytes) (Kritikou *et al.*, 2016).

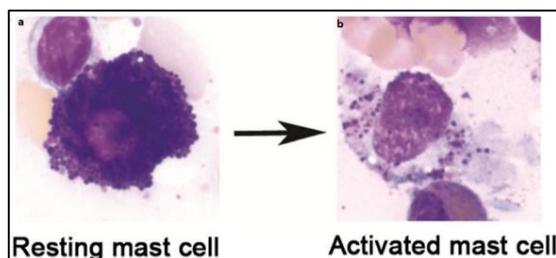


Figure 1 : Mastocytes humains a) au repos, riche en granules cytoplasmiques; b) dégranulé, raréfaction des granules et cytoplasme plus clair issus, de la moelle osseuse colorés au May-Grünwald/Giemsa. Grossissement 1000 X. Adapté de (Molderings *et al.*, 2016).

2. RÉACTION INFLAMMATOIRE MASTOCYTES-DÉPENDANTE AU COURS DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

Au cours de la phase inflammatoire de l'IDM (\approx 3-4 jours chez la souris), les populations de mastocytes résidents au niveau du tissu périvasculaire myocardique jouent un rôle important dans l'activation de la cascade inflammatoire. En effet, à la suite de leur stimulation avec les cytokines, l'adénosine, les espèces réactives de l'oxygène et l'activation du système du complément, les mastocytes dégranulent et libèrent leur contenu en médiateurs inflammatoires comme le facteur nécrosant tumoral alpha (TNF- α), l'histamine, la tryptase et la chymase (**figure 2**). À leur tour, l'histamine et le TNF- α déclenchent la réaction inflammatoire post-IDM. Dans les phases ultérieures, les mastocytes orchestrent l'interaction inter-cellulaire, la libération de cytokines et de facteurs de croissance des fibroblastes nécessaires pour leur prolifération. L'augmentation de la densité mastocytaire au niveau du tissu myocardique a été démontrée d'abord après 3 jours de l'induction de l'infarctus dans un modèle d'ischémie-reperfusion. Après 5-7 jours post-reperfusion, le nombre de mastocytes augmente au niveau des zones fibrosées. Cette augmentation est due principalement à un phénomène de recrutement de cellules précurseuses des mastocytes au cours du processus de guérison d'un IDM (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Le facteur de

cellules souches (*Stem Cell Factor*) est un chimio-attractant mastocytaire stimulant la motilité directionnelle des mastocytes. La synthèse du SCF est induite au niveau des macrophages accumulés au niveau du tissu myocardique ischémié (Frangiannis et al., 1998). Récemment, il a été démontré que la densité mastocytaire et l'expression du facteur de cellule souche chez des patients atteints de cardiomyopathie ischémique étaient élevées (Prabhu and Frangiannis, 2016).

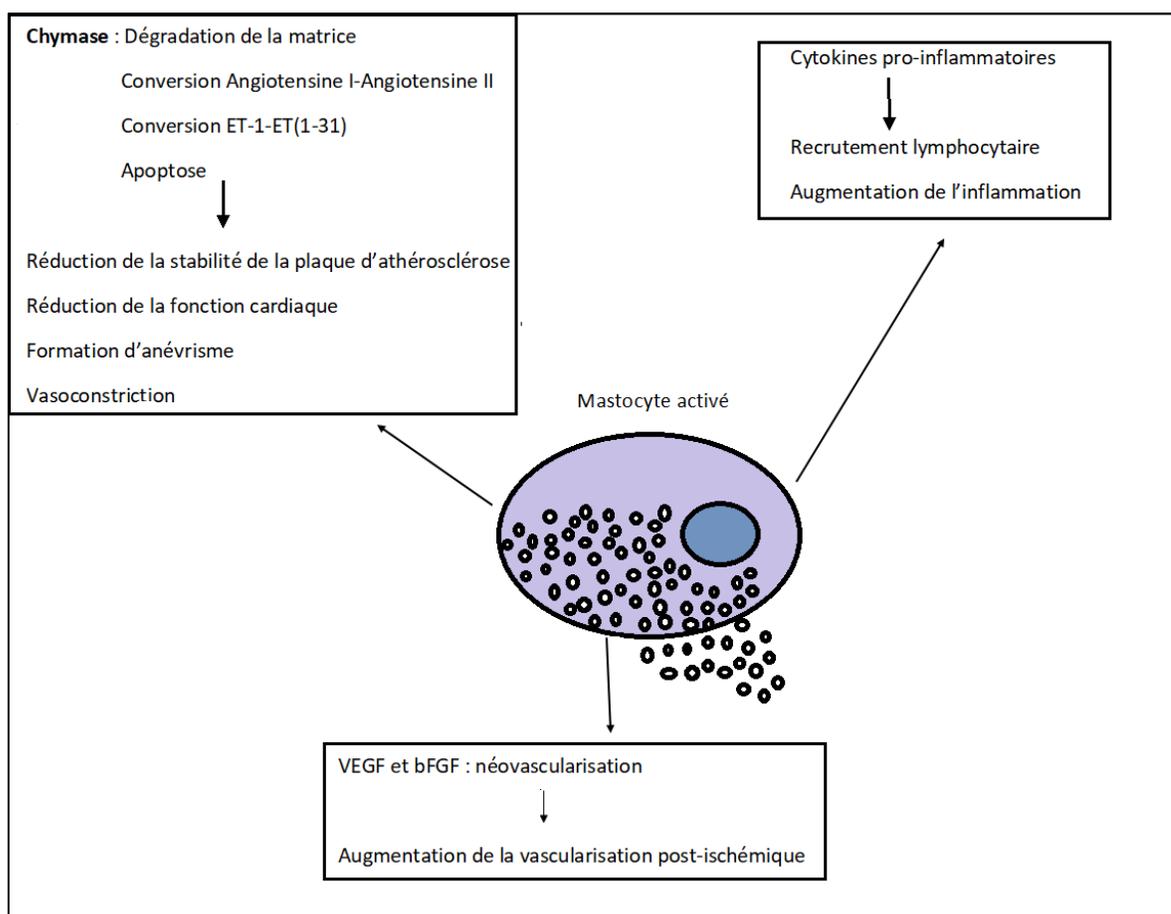


Figure 2 : Quelques médiateurs mastocytaires (chymase, cytokines pro-inflammatoires, VEGF et bFGF) et leurs effets au cours de l'infarctus du myocarde. VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire, bFGF : facteur de croissance fibroblastique basique
Adapté de (Bot *et al.*, 2008)

III. RÔLE DES MASTOCYTES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA FIBROSE POST-IDM

Le rôle des mastocytes dans la formation de fibrose a été démontré (**figure 3**). (Prabhu and Frangogiannis, 2016). En effet, les mastocytes sont impliqués dans la production de plusieurs facteurs activateurs qui influencent le développement, la prolifération et le comportement des fibroblastes. Les fibroblastes se différencient en myofibroblastes sous l'influence de plusieurs facteurs libérés, entre autres, par les mastocytes (tryptase, histamine et TGF- β) en plus du contact physique entre ces 2 types cellulaires. Les myofibroblastes sont responsables de la croissance et de la différenciation tissulaire des organes, dans la réponse inflammatoire et la cicatrisation via la production de facteurs de croissance et de cytokines. La réparation tissulaire est effectuée par ces cellules grâce à la synthèse de collagène, de fibronectine et de protéoglycanes. Un processus pathologique de dépôt de collagène aboutit à une fibrose tissulaire (Gailit *et al.*, 2001). D'un autre côté, le mastocyte induit la dégradation de la matrice extra-cellulaire par l'activation des métalloprotéinases. Ce double rôle du mastocyte suggère l'importance de son implication dans le remodelage cardiaque (Janicki *et al.*, 2015).

Sur le plan physiopathologique, la fibrose myocardique est un processus du remodelage de la matrice extra-cellulaire pouvant entraîner des troubles de la fonction cardiaque causée principalement par la rigidité de la paroi ventriculaire (Istrătoaie *et al.*, 2015).

Pour mieux comprendre leur rôle dans la lésion cardiaque et son remodelage, des modèles de souris déficients en mastocytes (W/W^V) ont été utilisés et dans lesquelles une réduction de la nécrose myocardique et une augmentation de la survie des cardiomyocytes furent rapportées (Bhattacharya *et al.*, 2007).

Au cours de l'IDM, les mastocytes sont des cellules inflammatoires activées par plusieurs stimuli. Plusieurs études ont mis en évidence la réaction inflammatoire systémique observée au cours de cette pathologie. La protéine C-réactive est l'un des marqueurs inflammatoires qui voit sa concentration plasmatique s'élever au cours de la phase aigüe des évènements coronariens (Berk *et al.*, 1990). De plus, il a été prouvé que des concentrations plasmatiques élevés d'IgE, un ligand activateur des mastocytes, sont présents chez des

patients présentant un syndrome coronarien (Guo *et al.*, 2016), en plus des niveaux plasmatiques élevés d'ET-1, étant un activateur mastocytaire (S. A. Doggrell, 2004). À part ces stimuli, plusieurs médiateurs libérés au niveau vasculaire pourraient activer les mastocytes comme le système du complément et les chémokines.

Le mastocyte joue alors le rôle de capteur au cours des réactions inflammatoires. Il répond de façon instantanée aux différents stimuli. Il est engagé pour restaurer l'homéostasie tissulaire à travers cette réponse participant ainsi à des mécanismes de défense et de réparation. Dépendamment de plusieurs facteurs, le mastocyte peut donc contribuer à défendre l'organisme contre une affection ou au contraire l'aggraver (Beghdadi, 2011).

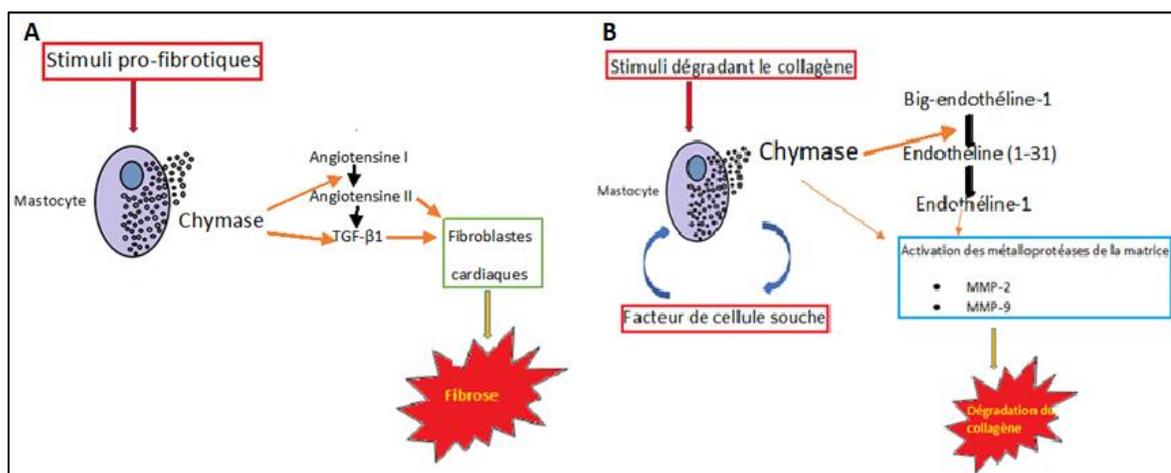


Figure 3 : Rôle de la chymase dans le remodelage cardiaque :

A) Fibrose chymase-dépendante au niveau du tissu cardiaque (production et activation du TGF-β1);

B) Dégradation du collagène chymase-dépendante au niveau du tissu cardiaque. Adapté de (Janicki *et al.*, 2015)

IV. RÔLE DE LA CHYMASE MASTOCYTAIRE AU COURS DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

1. LA CHYMASE

La chymase est une sérine protéase synthétisée et stockée dans les granules sécrétoires des mastocytes du tissu conjonctif. La chymase existe sous 2 formes α et β classées selon leurs structures et spécificités aux substrats. La chymase humaine est une α chymase ou CMA1. Chez la souris, la protéase mastocytaire murine de type 4 (*mMCP-4*) est une β chymase (S. Doggrell, 2004; Semaan *et al.*, 2015).

L'homme exprime un seul type de chymase tandis que la souris en exprime 4 types : mMCP-1, mMCP-2, *mMCP-4*, mMCP-5. La *mMCP-4* constitue l'homologue fonctionnel de la chymase humaine en termes de localisation et de spécificité envers ses substrats connus. La chymase humaine et la *mMCP-4* ont des spécificités similaires à la chymotrypsine (Wernersson and Pejler, 2014).

La chymase est stockée au niveau des granules sous forme d'enzyme inactive à cause du pH qui est maintenu à 5.5 au niveau des granules. Le pH optimal à l'activité de cette enzyme est situé entre 7 et 9. Son activité est d'emblée maximale une fois libérée au niveau de la matrice extra-cellulaire (pH=7.4) après activation mastocytaire. L'action de la chymase est uniquement locale puisqu'elle est immédiatement inhibée au niveau vasculaire (Takai *et al.*, 2004). Les inhibiteurs endogènes connus de la chymase sont l' α_1 -antitrypsin, l' α_2 -macroglobulin, et l' α_2 -antichymotrypsin (Lindstedt *et al.*, 2001). L'effet de la chymase peut être plus prolongé du fait qu'elle est associée à l'héparine sous forme de complexes au sein des granules. Une fois libérée, elle se fixe au niveau de la matrice extra-cellulaire et exerce un effet prolongé pouvant atteindre quelques semaines (S. Doggrell, 2004). La liaison de la chymase aux chaînes de protéoglycanes (chargées négativement) de l'héparine dans les restants des granules lui confère une stabilité contre les inhibiteurs endogènes (Lindstedt *et al.*, 2001).

2. EFFETS BIOLOGIQUES DE LA CHYMASE

La chymase est une endopeptidase (S. Doggrell, 2004). Elle est impliquée dans la synthèse de peptides vasoactifs : l'angiotensine II à partir d'angiotensine I et l'ET-1 (1-31)

précurseur intermédiaire de l'ET-1 à partir de la *Big* ET-1. La génération d'angiotensine II est importante pour la prolifération vasculaire (Wernersson and Pejler, 2014) et probablement pour le remodelage structurel au cours des pathologies cardiovasculaires (S. Doggrell, 2004).

La chymase participe aussi à l'activation du facteur de croissance transformant- β (TGF- β) en le libérant des protéines de la matrice des cellules épithéliales et endothéliales humaines. Le TGF- β joue un rôle dans la prolifération des fibroblastes incriminés dans les pathologies cardiovasculaires et la fibrose en induisant l'expression des gènes du collagène I et du collagène III (Takai *et al.*, 2004).

D'autre part, la chymase est responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire et des protéines des jonctions serrées et des hémidesmosomes, ce qui perméabilise la barrière endothéliale vasculaire et permet l'afflux de cellules inflammatoires (Wernersson and Pejler, 2014).

3. CHYMASE ET INFARCTUS DU MYOCARDE

Il a été prouvé qu'il y a une augmentation de l'activité chymasique cardiaque au niveau de la zone infarctée du ventricule gauche (Jin *et al.*, 2002). Dans l'optique de favoriser une réparation tissulaire efficace et de réduire le remodelage délétère à la suite de l'IDM (Frangogiannis, 2002), l'inhibition de la chymase mastocytaire a été proposée pour valider son rôle direct dans les phénomènes pathologiques observés en post-IDM. Cette approche a démontré dans un modèle d'IDM irréversible chez le hamster, les effets bénéfiques de l'inhibition de la chymase : l'amélioration de la fonction cardiaque et l'augmentation de la survie (Jin *et al.*, 2002). Des études plus récentes ont confirmé cette observation. Il a été démontré par exemple que l'inhibition de cette protéase diminue la fibrose dans plusieurs modèles de rongeurs en plus d'améliorer différents aspects (hypertrophie cardiaque, dysfonctionnement) relatifs aux pathologies cardiovasculaires dans ces modèles (Oyamada *et al.*, 2011; Galli *et al.*, 2015).

La chymase joue un rôle dans l'initiation de la réaction inflammatoire à travers la promotion de la dégranulation mastocytaire et l'aggravation de l'inflammation par l'activation de cytokines (Il-1 β , TGF- β) et la migration mastocytaire par l'activation de c-kit ligand (Sukenaga *et al.*, 2002).

In vitro, des études sur les sérines-protéases mastocytaires ont rapporté l'apoptose au niveau des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture, bien que le mécanisme sous-jacent n'ait pas été étudié (Hara *et al.*, 1999). Par ailleurs, la chymase est impliquée dans l'apoptose à travers la synthèse locale d'angiotensine II qui contribue à l'apoptose des cardiomyocytes et au dysfonctionnement ventriculaire gauche post-ischémie/reperfusion. Ces rôles de l'angiotensine II impliquent les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules vasculaires (Jugdutt, 2004).

Le facteur de croissance similaire à l'insuline (IGF-1) joue un rôle protecteur. En effet, il constitue un substrat de la chymase en plus de son effet protecteur inhibant l'apoptose. La dégradation de l'IGF-1 par des niveaux élevés de la chymase due principalement à l'invasion mastocytaire post-IDM favorise l'apoptose des cardiomyocytes et l'extension de la zone d'infarctus dans le modèle d'ischémie reperfusion chez la souris (Tejada *et al.*, 2016).

La répression génétique de la m MCP-4 (Tchougounova *et al.*, 2003) a montré, dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion, la réduction de la taille de l'infarctus, la diminution du dysfonctionnement cardiaque et la limitation du remodelage délétère post-IDM (Tejada *et al.*, 2016).

L'inhibition de la chymase confère de plus une cardioprotection à travers la préservation des connections intercellulaires impliquant la fibronectine et la vitronectine. En effet, les lésions cellulaires et l'inflammation augmentent plusieurs protéases comme la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9) responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire, la diminution de la signalisation intercellulaire et l'augmentation de l'apoptose et de la nécrose (**figure 4**) (Oyamada *et al.*, 2011).

4. MORT CELLULAIRE AU COURS DE L'IDM

Deux mécanismes de mort cellulaire sont présents au cours de l'infarctus du myocarde : la nécrose et l'apoptose. La nécrose de coagulation observée dans ce cas est caractérisée par une contraction myofibrillaire, des mitochondries œdématisées ou rompues, une rupture des sarcolemmes, une destruction microvasculaire, une hémorragie et une infiltration leucocytaire. Ces signes histologiques sont plus manifestes en cas de reperfusion.

La surcharge en calcium entraînant une contraction excessive des myofibrilles, la digestion du cytosquelette et des sarcolemmes et la surproduction de radicaux libres de l'oxygène contribuent à la nécrose cellulaire.

L'apoptose constitue la voie programmée de la mort cellulaire au sein du myocarde infarci. La contribution de ce mécanisme dans la mort cellulaire observée au cours de l'IDM n'est pas encore bien établie. L'apoptose est un mode de mort cellulaire énergie-dépendant avec fragmentation de l'ADN et réduisant la réponse inflammatoire. Cette mort cellulaire programmée est initiée par des récepteurs au niveau des sarcolemmes et la libération des cytochromes c des mitochondries lésées. La mort des cardiomyocytes est caractérisée par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriaux. L'autophagie constitue la voie de dégradation protéique lysosomale particulièrement des protéines mitochondriales. Elle est importante pour le recyclage. Son rôle dans l'ischémie /reperfusion et la cardioprotection chez l'homme est mal connu. La nécroptose (ou nécrose programmée) quant à elle, est initiée par l'activation de récepteurs de mort cellulaire, spécifiques aux kinases (comme la protéine 1 interagissant avec le récepteur: RIP1), et partage plusieurs aspects avec la nécrose et l'apoptose. La contribution de chaque mécanisme de mort cellulaire au cours de l'IDM reste à élucider (**figure 5**) (Heusch and Gersh, 2016).

Plusieurs moyens ont été développés pour étudier le phénomène d'apoptose observé au cours de l'IDM. Ce phénomène est secondaire à plusieurs causes telles que la lésion de reperfusion, les forces imposées par une surcharge ventriculaire en plus de l'hypoxie qui active le programme de suicide des cardiomyocytes *in vitro* (Kajstura *et al.*, 1996).

Pour étudier la contribution de l'apoptose dans la mort des cardiomyocytes post-IDM, un test nommé marquage de dUTP terminal médié par la deoxynucleotidyl transférase terminale (TUNEL) est largement utilisé mais il manque de spécificité et son interprétation est controversée. La découverte de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire programmée et l'identification du rôle des caspases comme étant un médiateur clé ont permis une mesure directe et précise de l'apoptose au niveau des coupes tissulaires en utilisant des anticorps qui reconnaissent la caspase-3 active (Duan *et al.*, 2003).

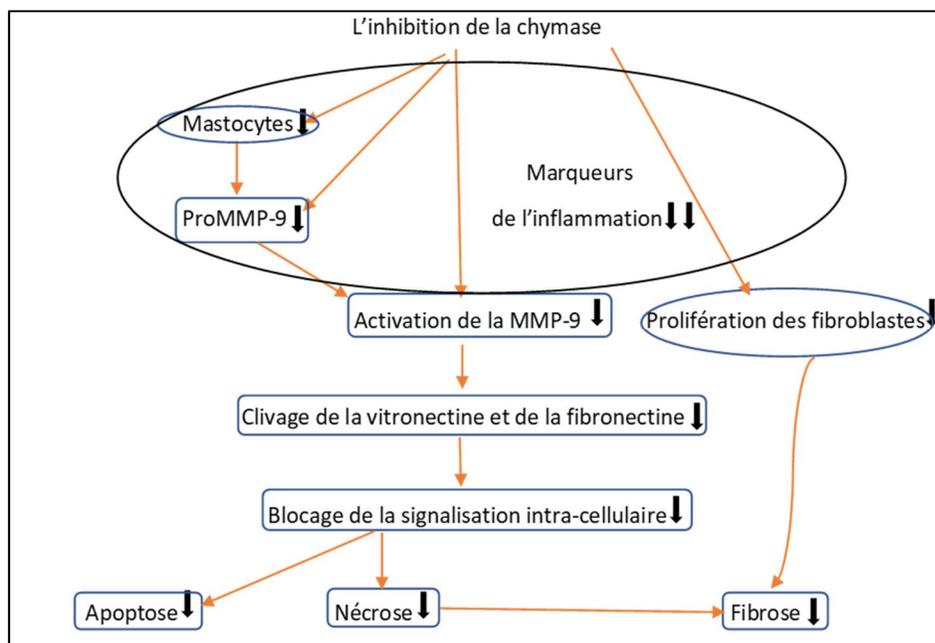


Figure 4 : Diagramme représentatif de l'effet de l'inhibition de la chymase sur la protection myocardique et la fibrose. Cette inhibition exerce un rôle protecteur via la diminution des marqueurs inflammatoires comme la MMP-9, la préservation des adhésines intercellulaires, la conservation de la communication intercellulaire, la préservation de la signalisation intra cellulaire, diminution de l'apoptose et de la nécrose. En inhibant la chymase, moins de fibrose cardiaque est formée en éliminant son effet sur la prolifération des fibroblastes. (Adapté de Oyamada *et al.*, 2011).

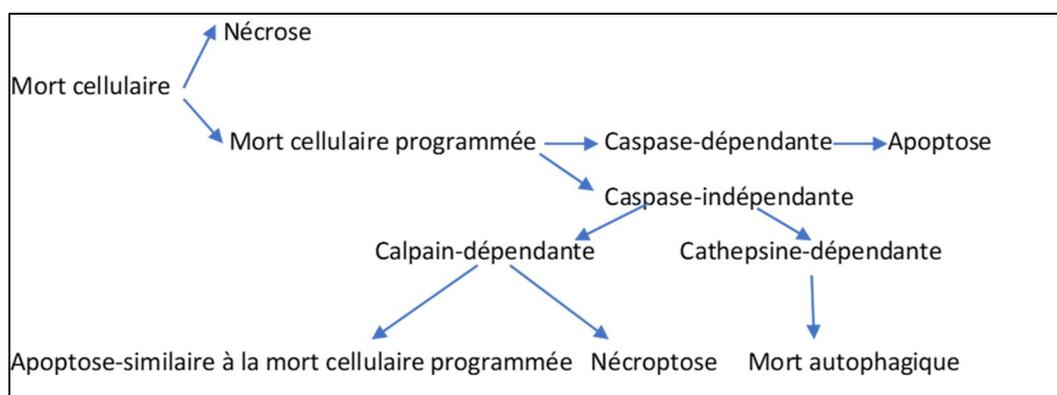


Figure 5 : Mécanismes de mort cellulaire (Adapté de Nikolettou *et al.*, 2013)

V. PEPTIDE NATRIURÉTIQUE CÉRÉBRAL

Le BNP est un peptide natriurétique qui a été isolé pour la première fois au niveau du cerveau de porc. Il a été extrait ensuite au niveau des ventricules cardiaques. C'est une hormone cardiaque sécrétée de façon prédominante au niveau des ventricules (Morita *et al.*, 1993). Le BNP est synthétisé au niveau des cardiomyocytes et libéré au niveau sanguin à la suite d'un étirement de paroi ventriculaire gauche (Sergeeva *et al.*, 2014).

Au niveau plasmatique, il est considéré comme un marqueur précoce et précis de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque ainsi que leurs évolutions. Le BNP a un effet diurétique et natriurétique qui permet une meilleure adaptation à ces conditions.

Au cours de l'installation d'un remodelage cardiaque à la suite d'un IDM, le BNP est chroniquement élevé et il constitue un puissant marqueur de la sévérité de l'insuffisance cardiaque consécutive et de son évolution. Le BNP ne constitue pas seulement un marqueur qui guide le traitement au cours de cette pathologie mais aussi il participe au remodelage cardiaque inapproprié précoce. En plus, des taux élevés de BNP indique un risque d'arythmies ventriculaires et d'arrêt cardiaque spontané. Une meilleure survie au cours de l'insuffisance cardiaque est associée à de faibles taux de BNP. L'élévation pathologique du BNP plasmatique devrait être une indication pour le traitement par un bêtabloquant (Thireau *et al.*, 2012).

VI. L'ENDOTHÉLINE-1

La famille des endothélines regroupe 3 membres de peptides de 21 acides aminés, de structure similaire. Les endothélines 1 et 2 agissent avec la même affinité sur des récepteurs couplés à la protéine Gq : ET_A et ET_B. Le peptide vasoconstricteur dérivé de l'endothélium a été identifiée en 1988. L'ET-1 est le plus puissant vasoconstricteur découvert de nos jours. Il produit une puissante vasoconstriction soutenue dans le temps, *in vitro* et *in vivo*.

Chez l'homme, l'endothéline-2 et l'endothéline-3 ont été découverts en 1989. Les récepteurs à l'ET-1 ont été découverts en 1990. Une différence d'affinité aux 2 récepteurs a été mise en évidence entre les différentes isoformes d'ET.

La synthèse de l'ET-1 se fait à partir de la *Big-ET-1*, un peptide intermédiaire de 38 acides aminés, dérivé de la *pro-ET-1* pour produire un peptide mature de 21 acides aminés

(figure 6). Des enzymes impliqués dans la conversion de la *Big*-ET-1 en ET-1 sont les enzymes de conversion de l'ET 1 et 2 : ECE-1 et ECE-2.

Le gène de l'ET-1 code pour un précurseur formé de 212 acides aminés : la pré-pro endothéline. La peptidase-signal génère la pro endothéline qui est clivée à son tour par une furine pour produire la *Big*-endothéline. Grâce au clivage par l'enzyme de conversion de l'ET-1 : ECE-1 qui est enzyme membranaire (activité optimale à pH 7) (Davenport *et al.*, 2016).

Une voie alternative de la synthèse de l'ET-1 a été identifiée. En effet, la chymase est impliquée dans la synthèse de l'ET-1 en synthétisant un intermédiaire : l'ET-1(1-31), un peptide de 31 acides aminés, à partir de la *Big* ET-1. La neprilysine (NEP) est nécessaire pour la conversion de l'ET-1(1-31) en ET-1(1-21). Parallèlement à la chymase humaine, la *mMCP-4* est capable de convertir la *Big* ET-1 en ET-1 (1-31) *in vivo* (Semaan *et al.*, 2015).

L'ET-1 est synthétisée au niveau de la cellule endothéliale vasculaire et épithéliale pulmonaire, rénale, colique, les macrophages, les monocytes, les cellules gliales périphériques et du plexus choroïde, certains neurones et les cellules gliales réactives au niveau du système nerveux central. La synthèse de l'ET-1 au niveau de l'endothélium vasculaire a été largement étudiée. Les niveaux de la pré-proendothéline est régulée au niveau transcriptionnel. Des stimuli physiques et chimiques au niveau vasculaire sont responsables de l'augmentation de sa synthèse régulée : l'étirement du vaisseau, l'hypoxie, la thrombine, facteurs vasoactifs.

L'ET-1 est synthétisée et libérée en continu à partir de la cellule endothéliale vasculaire par voie constitutive responsable du maintien d'un tonus vasculaire normal. L'ET-1 a été localisée avec l'ECE-1 (Takahashi *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994) et l'ECE-2 (Emoto and Yanagisawa, 1995) dans des vésicules de stockage de Weibel-Palade. Ces vésicules sont dégranulées à la suite de stimuli chimiques ou mécaniques (Davenport *et al.*, 2016).

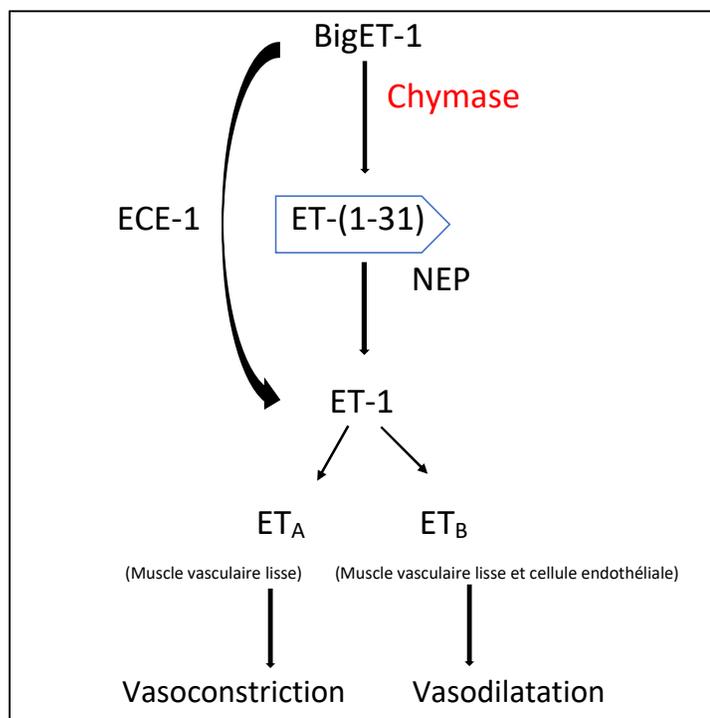


Figure 6 : Représentation schématique du clivage de la *Big Endothéline-1* par l'enzyme de conversion de l'ET-1 et la chymase pour produire l'ET-1 et l'endothéline-1 (1-31), et les effets vasculaires de l'ET-1, adapté de (Kuruppu *et al.*, 2013).

VII. RÉCEPTEURS À L'ENDOTHÉLINE

Deux types de récepteurs aux endothélines sont connus soit, ET_A et ET_B . Ils appartiennent à la classe 1 des récepteurs à 7 domaines trans-membranaires couplés à la protéine G. L'expression relative la plus élevée du récepteur ET_A est située au niveau du cœur et des poumons (organes de souris) soulignant l'importance du système endothélial au niveau cardiovasculaire. Le récepteur ET_B est exprimé de façon importante au niveau des poumons. Au niveau des tissus humains, les poumons représentent la densité la plus élevée en récepteurs à l'ET-1. Le récepteur ET_A prédomine au niveau des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et des vaisseaux de haute résistance. La majorité des récepteurs ET_B sont localisés au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses d'où il contribue à la résistance vasculaire et à la bronchoconstriction.

Dans l'hypertension artérielle pulmonaire, le taux d'ET-1 est élevé au niveau des poumons explantés de patients, en plus de l'augmentation de la densité des 2 types de récepteurs à l'ET-1 au niveau des artères pulmonaires distales. L'augmentation de l'ET-1 au cours de cette pathologie induit une vasoconstriction soutenue, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, la fibrose et l'hypertrophie.

Au niveau du cœur humain, les 2 récepteurs sont exprimés au niveau des oreillettes et des ventricules et du septum avec une prédominance du récepteur ET_A. Le récepteur ET_B prédomine au niveau du tissu conducteur. L'effet de l'ET-1 est inotrope positif.

Au niveau du ventricule gauche de patients atteints de cardiopathie ischémique, le niveau d'expression du récepteur ET_A augmente de 50%, celui du récepteur ET_B reste inchangé.

Dans les conditions physiologiques, l'ET-1 est l'isoforme la plus abondante au niveau du système cardiovasculaire. Dans les situations pathologiques, l'augmentation de la production d'ET-1 entraîne une vasoconstriction en plus d'un remodelage vasculaire. Les 2 types de récepteurs maintiennent un tonus vasculaire basal. Le niveau d'expression du récepteur ET_B peut varier en conditions pathologiques induites chez les animaux.

La couche endothéliale représente 1% du poids d'un vaisseau. Elle le tapisse en formant une couche monocellulaire. Le récepteur ET_B siégeant au niveau de la cellule endothéliale joue un rôle vasodilatateur grâce à la libération d'oxyde nitrique, de facteur endothélial hyperpolarisant et de prostacycline. Un niveau faible d'ET-1 est vasodilatateur tandis qu'à un niveau élevé entraîne une augmentation de la pression artérielle et des résistances vasculaires périphériques. En plus de son rôle vasodilatateur, le récepteur ET_B est impliqué dans la clairance de l'ET-1 de la circulation. Il internalise le complexe ligand-récepteur et élimine l'ET-1 de la circulation. Chez l'homme, les poumons, le foie et les reins sont les organes de clairance de l'ET-1 (Davenport *et al.*, 2016).

BUT DE L'ÉTUDE

Au cours de l'infarctus du myocarde, à travers son contenu en chymase, le mastocyte est responsable de plusieurs mécanismes pathologiques prouvés dans des modèles animaux d'IDM principalement sur le remodelage cardiaque et ses conséquences précoces et tardives.

Il a été démontré que la chymase a un rôle délétère sur la survie des animaux, ainsi que sur la taille de l'infarctus, la fonction cardiaque et le remodelage du ventricule gauche en post-infarctus du myocarde.

Par le biais d'un modèle de souris réprimée pour la mMCP-4, et suite à un infarctus du myocarde permanent, les marqueurs relatifs au rôle délétère de la chymase pourraient être mis en évidence.

Le but de cette étude a été d'identifier le rôle modulateur de la chymase au niveau de l'expression des facteurs cardiaques dans l'infarctus du myocarde chez la souris.

Nous suggérons à titre d'hypothèse principale que la mMCP-4 module l'apparition de marqueurs cardiaques et systémiques associés à l'IDM dans le modèle d'infarctus du myocarde permanent chez la souris.

OBJECTIFS EXPÉRIMENTAUX

- 1- Comparer la survie des souris *WT* vs souris *mMCP-4KO* après l'induction d'un infarctus du myocarde sur 7 jours.
- 2- Quantifier les concentrations sériques du BNP), signant l'évolution post-infarctus dans les 2 souches de souris.
- 3- Étudier la densité mastocytaire au niveau du tissu myocardique et dans la cavité péritonéale à la suite de l'infarctus du myocarde ainsi que leur activité chymasique au niveau péritonéal.
- 4- Étudier la fibrose myocardique post-infarctus dans les 2 souches de souris.
- 5- Étudier l'apoptose au niveau du tissu myocardique post-infarctus dans les 2 souches de souris.
- 6- Valider le rapport entre les concentrations élevées d'ET-1 et les niveaux d'expression de ses récepteurs ET_A et ET_B au niveau pulmonaire en post-IDM.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. ANIMAUX

Deux souches de souris ont été utilisées dans cette étude. La première souche est constituée de souris C57Bl/6J (souche sauvage nommée aussi *WT*) commandées chez Charles River (St-Constant, Québec, Canada) et la 2^{ème} souche est réprimée en protéase mastocytaire murine de type 4 (*mMCP-4(-/-)*). Cette souche a été fournie par Dr. Gunnar Pejler (Uppsala University, Suède). Les 2 souches de souris ont été élevées dans notre établissement. Des croisements entre des couples de chaque souche permet la disponibilité des souris à long terme. L'identité génétique des descendants de la souche de souris *KO* a été validée par génotypage.

Tous les animaux sont gardés à température constante (23 degrés Celcius) et humidité stable (78%), sous contrôle de lumière/obscurité 12h/12h. Une nourriture standard non-raffinée (5075-U.S. Charles River Rodent, St-Constant, Québec, Canada), composée de 18.1% de protéines brutes, 4.5% de gras brut, 3.5 % de fibre, 6.7% de cendre et 2.5% de minéraux ajoutés et de l'eau du robinet sont fournies *ad libitum*.

Le soin des animaux et les expériences ont été approuvés par le comité d'éthique de la recherche sur les animaux de la faculté de médecine et de sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke selon les directives du conseil canadien de protection des animaux.

II. INDUCTION DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

Des souris mâles de 8 à 12 semaines sont pesées et anesthésiées avec un mélange de Kétamine/Xylazine (87/13 mg/kg) par voie intra musculaire (Kétamine : Bioniche, Belleville, Ontario, Canada; Xylazine : Bimeda, Cambridge, Ontario, Canada). Un délai de 10 minutes est respecté avant de commencer à manipuler la souris.

La paroi antérieure de la cage thoracique est subséquentement rasée. Une désinfection de la peau est réalisée à l'éthanol 70% suivie d'une solution de Povidone Iodée USP 10% (Rougier, Toronto, Canada).

Une intubation oro-trachéale est ensuite effectuée (Intracan Safety IV Catheter, B. Brown Medical Inc, États Unis). La souris est branchée à un ventilateur mécanique (Harvard

Apparatus, Mouse Ventilator, modèle 687, Holliston, Massachusetts, États-Unis). La fréquence de ventilation (à cage thoracique ouverte et à cage fermée) et le volume ventilatoire sont préréglés en fonction du poids de l'animal selon le **Tableau 1**.

La souris est maintenue à une température corporelle physiologique avec une lampe et fixée à la table chirurgicale avec du ruban adhésif. La chirurgie se fait sous microscope. La peau est ouverte en regard du sternum sur environ 1.5 cm longitudinalement. Le plan musculaire gauche est écarté après interposition d'un champ stérile. Le troisième espace intercostal est ouvert à environ 5 mm du bord sternal et la troisième cote est soulevée grâce à un fil de soie (6-0) (Perma-Hand silk, Ethicon, Ontario, Canada) pour exposer le cœur. Le péricarde est ouvert et l'artère coronarienne antérieure descendante gauche est repérée. Une ligature permanente est réalisée au fil de soie (8-0) (Ethilon, Ethicon, Ontario, Canada) à 1 mm du bord inférieur de l'oreillette gauche. La pâleur de la paroi antérieure du ventricule gauche arrivant jusqu'à l'apex (**figure 7**) est vérifiée en plus que la paroi antérieure du ventricule gauche devient hypokinétique. Un deuxième nœud plus latéralisé vers la gauche peut être ajouté en cas d'incertitude. Cette technique de ligature a été utilisée par plusieurs groupes de chercheurs (Kumar *et al.*, 2005; Patten *et al.*, 1998) La fermeture de la cage thoracique se fait plan par plan. L'espace intercostal est fermé par 2 à 3 nœuds au fil de soie (6-0). Une aspiration douce du thorax se fait avant de serrer le dernier nœud grâce à une seringue canulée de PE-50. Le plan musculaire est suturé avec du fil de soie (6-0). La peau est fermée au fil de nylon (6-0) (Monosof, Covidien, république Dominicaine). La cage thoracique de la souris SHAM est ouverte de la même façon. Par contre, le fil (8-0) est passé en dessous de l'artère coronarienne antérieure descendante gauche sans ligature.

La ventilation mécanique est maintenue 30 minutes après la fermeture. La souris est extubée quand elle manifeste des signes de réveil : bouge ses moustaches, ses pattes.

La souris est gardée sous lampe de chauffage jusqu'au lendemain. Elle reçoit de la buprénorphine (Vetergesic, Ceva Animal Health Ltd, Amersham, Bucks, UK) 0.1 mg/kg aux 6 heures au besoin pendant 24 heures.

Un groupe de ces souris opérées ont été soumises à un test de survie pendant 7 jours. D'autres ont été prélevées au jour 1, 3 ou 7 post-opératoire pour des essais *ex vivo*. Les organes prélevés sont : le cœur ainsi pesé est fixé dans de la formaline et les poumons (séparés en lobes, pesés et gardés au -80°C).

L'ensemble des chirurgies a été étalé sur le temps de façon aléatoire (*WT* et *mMCP-4KO*) et au besoin pour compléter les séries d'analyses. Seules les souris ayant eu un bon infarctus à l'autopsie ont été retenues pour les différents tests effectués. Les souris opérées présentant un petit infarctus (<2/3 de la surface de la paroi du ventricule gauche) sont automatiquement éliminées. Chaque souris a été opérée une seule fois, étant donné que la taille estimée de l'infarctus n'est objectivée qu'au jour du prélèvement.

Le **tableau 2** résume la procédure de la chirurgie aux prélèvements.

Tableau 1 : Paramètres du respirateur en fonction du poids de la souris :

Poids de la souris (g)	Fréquence respiratoire/min (cage thoracique ouverte)	Fréquence respiratoire/min (cage thoracique fermée)	Volume respiratoire (μ l)
22	144	124	150
23	143	123	157
24	141	121	163
25	140	120	170
26	138	118	175
27	137	117	181
28	136	116	187
29	134	114	193
30	133	113	200
31	132	112	205

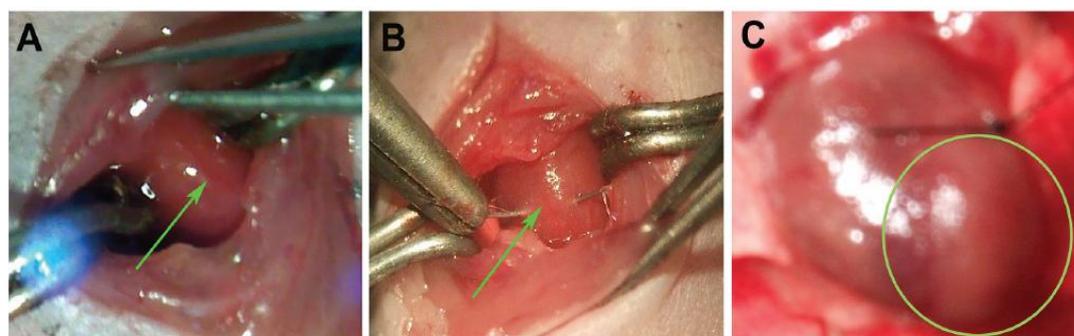


Figure 7: Technique de ligature de l'artère coronaire descendante antérieure gauche. (A) exposition de la coronaire (flèche verte). (B) Ligature permanente de la coronaire gauche avec du fil 8-0 (flèche verte). (C) Confirmation de l'infarctus : pâleur de la paroi antérieure gauche du ventricule gauche englobant l'apex (cercle vert) (Wang *et al.*, 2014)

Tableau 2 : Présentation simplifiée de la surveillance et des dates de prélèvement des souris opérées sham et infarctées, *WT* et *mMCP-4KO*

Jour 0	Jour 1	Jour 3	Jour 7
-Chirurgie -Buprénorphine	-Prélèvement du groupe opéré 1 jour (plasma, cœur, poumons, mastocytes péritonéaux) -Surveillance des groupes 3 et 7 jours	-Prélèvement du groupe 3 jours (plasma, cœur, poumons, mastocytes péritonéaux) -Surveillance du groupe 7 jours	-Prélèvement du groupe 7 jours (plasma, cœur, poumons, mastocytes péritonéaux)

III. ANALYSE DE SURVIE KAPLAN-MEIER

Un infarctus du myocarde a été induit, de façon aléatoire, chez des souris *WT* (n=19) et *m MCP-4KO* (n=20). Elles ont été suivies pendant 7 jours pour dresser la courbe de survie. La date et la cause du décès (à l'autopsie) ont été notées. Au jour 7, les souris survivantes sont euthanasiées et le sang, le cœur, les poumons, le tibia gauche sont prélevés.

IV. PRÉLÈVEMENT SANGUIN

Au jour du prélèvement (1, 3 ou 7 jours post-opératoires), la souris est anesthésiée avec de la kétamine/Xylazine en intra musculaire. L'artère carotide gauche est canulée avec du PE-10 (Beckton Dickinson Intramedic, VWR, Ville Mont-Royal, Québec) préalablement hépariné (Sandoz Canada Inc, Boucherville, Québec, Canada). Un volume de 700 µl de sang est prélevé dans du citrate de sodium 10% (Fisher ChemAlert, New Jersey, États-Unis). Le sang est ensuite centrifugé à 1000g pendant 15 minutes à température pièce. Le plasma est aliquoté et conservé au -80° jusqu'à utilisation ultérieure.

V. PROTOCOLE D'EXTRACTION DES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX

Au jour post-opératoire fixé (1, 3 ou 7 jours), le cœur et les poumons ainsi prélevés, une extraction des mastocytes contenus dans la cavité péritonéale est effectuée chez ces souris par lavage (péritonéal) selon le protocole qui suit (Malbec *et al.*, 2007). La face antérieure de l'abdomen est aspergée d'éthanol 70%. Après séchage, un morceau de peau est coupé pour avoir accès à la cavité péritonéale. Cinq millilitres de la solution du tampon d'isolation (PBS, BSA 1mg/ml (Albumine sérique bovine, Sigma, Life Science, États-Unis) et héparine 0.5 mg/ml) est injectée dans la cavité. L'abdomen est massé pour 1 minute. On effectue une petite ouverture de la membrane péritonéale afin de récupérer le volume avec une pipette Pasteur (Sati international Scientific, Canada).

Le fluide recueilli est centrifugé à 200g pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré et les cellules sont suspendues dans une solution du milieu RPMI-1640 (RPMI 1640 1X, Multicell, Wisent Inc., Québec, Canada) contenant du BSA 1mg/ml 100 U/ml de Pénicilline (Wisent, Montréal, Québec, Canada). La suspension cellulaire est ensuite incubée dans une boîte de pétri pendant 1h à 37°C. Le milieu de culture est ensuite récolté et la boîte de pétri est lavée avec du PBS pH=7.4. Le volume recueilli est centrifugé à 200g pendant 5 minutes. Les

cellules sédimentées sont re-suspendues dans 1 ml du tampon d'isolation. Les cellules sont comptées selon la méthode de Moore and James. En effet, une solution de Bleu de Toluidine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) est utilisée pour colorer les mastocytes en rouge violet et permettre leur décompte. Une solution mère de Bleu de Toluidine est préparée à 0.05% dans de la saline 0.9% (Baxter, Mississauga, ON, Canada). Une solution de travail est préparée en ajoutant à la solution mère (4 ml=76.93%), de l'éthanol 95% (1.1ml=21.15%) et une solution de saponine dans 50% d'éthanol (0.1ml=1.92%). Pour colorer les cellules, un volume de la suspension de mastocytes est ajouté à un volume de la solution de bleu de Toluidine. Le décompte se fait, selon la technique de Moore and James (Moore and James, 1953) à l'aide d'un hématimètre sous microscope optique au grossissement 40. Le nombre de mastocytes /ml est calculé de la façon suivante : Nombre de cellules comptées (10 carrées) *1000*facteur de dilution (avec 1000 étant un volume de 1ml et le facteur de dilution=2 puisqu'on dilue un volume dans un autre volume égal).

Les cellules sont re-sédimentées par centrifugation à 200g pendant 5 minutes et sont re-suspendues dans du PBS pH=8 pour obtenir une concentration de 10000 cellules/ml. Les échantillons sont aliquotés et conservés à -80 C jusqu'aux essais enzymatiques.

VI. ACTIVITÉ DE TYPE CHYMOTRYPSINE DES MASTOCYTES IN VITRO

Le contenu mastocytaire en chymase (*mMCP-4*) ayant une activité de type chymotrypsine est évalué après différents délais de l'infarctus du myocarde (1, 3 et 7 jours). Le jour de l'expérience, les échantillons de mastocytes péritonéaux antérieurement prélevés sont dégelés. À l'aide d'un substrat fluorogénique, le Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7 amino-4-methylcoumarin (AMC) (Peptide Institute, Osaka, Japon) à 10 μ M, l'activité de type chymotrypsine de la *mMCP-4* est mesurée par la fluorescence émise par la molécule d'AMC après le clivage enzymatique du substrat sur 20 minutes à 37°C avec un spectrophotomètre à fluorescence (ex:370 nm ; em:460 nm) (Molecular Devices, Sunnyvale, Canada).

Les mastocytes issus de la souche *mMCP-4KO* sont incapables de cliver le substrat donc d'émettre de la fluorescence (Semaan *et al.*, 2015).

VII. ELISA BNP

Le taux plasmatique de BNP a été déterminé au niveau du plasma de souris infarctées et shams 1, 3 et 7 jours post-opératoires comparées à des souris saines de la même souche grâce à un kit spécifique (Mouse Brain Natriuretic Peptide (BNP) ELISA Kit, MyBiosource, San Diego, États-Unis). L'équation de la courbe standard est utilisée pour déterminer la quantité de BNP par échantillon. Il n'y a pas de réactivités croisées de ce dosage avec d'autres facteurs natriurétiques. Le seuil de détection du kit est de 12pg/ml.

VIII. EXTRACTION D'ARN ET qPCR

Le kit RNeasy pour tissu fibreux (Qiagen, Toronto, ON, Canada) a été utilisé pour extraire l'ARN total pulmonaire.

Les poumons de souris *WT* et *m MCP-4KO* (infarctées et sham, prélevés à 1, 3 et 7 jours post-infarctus) sont homogénéisés congelés grâce à un homogénéisateur (Scilogex, Rocky Hill, États Unis) pendant 45 secondes dans 300 μ L de tampon RLT. L'extraction est faite selon les recommandations du manufacturier du kit. La DNase du kit est remplacée par la RNase-free DNase SET (OMEGA BIO-TEK, Georgia, USA). La quantification relative de la β actine, des récepteurs ET_A et ET_B a été mesurée en temps réel grâce à la fluorescence émise par l'intercalation du SYBR Green (Perfecta SYBR Green SuperMix, low ROX; Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). La β actine est utilisée comme un contrôle interne dans les 2 souches de souris, étant donné qu'elle est stable entre les 2 souches et même en condition pathologique. Les courbes de dissociation à la fin de la qPCR ont été spécifiques de l'amplification du gène concerné sans présence d'épaulement. Un seul pic est obtenu pour chaque gène utilisé.

Le niveau d'expression est déterminé par le calcul de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001). Les séquences des amorces (épargnant les jonctions exon-exon) utilisées, ainsi que les conditions des différentes étapes d'amplification sont présentées dans le tableau suivant (tableau 3) :

Tableau 3 : Amorces et conditions de la qPCR des récepteurs à l'ET-1

	Amorce sens	Amorce Antisens	Conditions
Récepteur ET _A	5'-CAA CCA TTA CGC CAC AGA-3'	5'-CAG GAA AGA CCC ATT GGC-3'	[Amorce]= 300nM Dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min Dénaturation à 95°C pendant 30 s Hybridation à 60°C pendant 30s Élongation à 72°C pendant 1 min Dénaturation finale à 95°C pendant 1 min Élongation finale à 55°C pendant 30 s
Récepteur ET _B	5'-TCA ACA CCG GAT ATA TTC ACG GGC-3'	5'-GCT CTG CTG AAG TGC TGA CTA AGA-3'	*40 cycles
β actine	5'-GAT CAA GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC- 3'	5'-GCA GCT CAG TAA CAG TCC GCC TAG- 3'	Dénaturation finale à 95°C pendant 30 s.

IX. HISTOLOGIE

Les cœurs sham et infarcis, *WT* et *KO* prélevés à 1, 3 et 7 jours sont fixés dans la formaline (10% Buffered Formalin Phosphate, Fisher Scientific, New Jersey, États Unis). Ensuite, les cœurs sont coupés transversalement à environ 1 mm de la ligature selon l'axe transversal du cœur, et transférés dans des blocs de paraffine. Des coupes de 5 μm sont subséquemment effectuées pour études histologiques et immunohistochimiques.

1. COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE

Les mastocytes cardiaques ont été mis en évidence grâce à la coloration au Bleu de Toluidine. Les coupes de cœurs sur lames sont déparaffinées et réhydratées dans de l'eau distillée. L'incubation de la coloration de bleu de Toluidine s'est faite pendant 15 minutes. Ensuite, les lames ont été lavées 3 fois à l'eau distillée. Puis, elles ont été séchées à l'air pendant 12h, avant de les couvrir avec des lamelles.

La quantification des mastocytes a été réalisée par décompte de ces cellules au niveau des zones péri infarcies sur les coupes de cœurs et en exprimant ce décompte par mm^2 . En effet, 2 champs par zone ont été étudiés dans les cœurs infarcis de 1, 3 et 7 jours. Au niveau des cœurs des souris shams, une zone équivalente à la zone péri-infarctie a été étudiée de la même façon.

2. COLORATION AU *PICRO SIRIUS RED*

La fibrose a été mise en évidence grâce à la coloration au *Picro Sirius Red* qui marque le collagène de type I et III. Les coupes sont déparaffinées et réhydratées. Les noyaux sont colorés avec de l'hématoxyline de Weigert pendant 8 minutes. Les lames sont lavées avec de l'eau du robinet courante pendant 10 minutes. La coloration au *Picro Sirius Red* (Direct Red 80, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) se fait pendant une heure. Les lames sont lavées à l'eau acidifiée (5 ml d'acide acétique dans 1 litre d'eau). Les coupes sont déshydratées par 3 passages dans de l'éthanol 100% puis éclaircies dans du xylène.

X. ÉPAISSEUR MINIMALE DU VENTRICULE GAUCHE

L'épaisseur minimale est mesurée sur les coupes de cœurs colorées au *Picro Sirius Red*. La zone d'intérêt est située au niveau de la zone infarctie en cas d'infarctus et la paroi libre du ventricule gauche pour les shams.

XI. IMMUNOHISTOCHIMIE

Les étapes d'immunomarquage ont été effectuées selon les recommandations du fabricant *Dako* de l'Amérique du nord. Les lames sont assujetties à un processus d'immunomarquage automatisé (*Dako Autostainer plus*, Agilent, Santa Clara États Unis) qui utilise le système *Envision Flex high pH visualization* (*Dako North America Inc.*, Agilent, Santa Clara, États Unis). Les coupes de cœurs sur lames sont soumises à une procédure de déparaffinage, de réhydratation et de démasquage d'épitope dans un bain Marie pendant 20 minutes grâce à un *EnVision FLEX Target Antigen Retrieval Solution Low pH*. La peroxydase endogène est bloquée grâce au réactif *EnVisionFLEX Peroxydase-Blocking Reagent*.

L'anticorps primaire de lapin anti-caspase-3 active (Cleaved Caspase-3 antibody (Asp 175), No de catalogue 9661, Cell Signaling, Ontario, Canada) est dilué à 1/800 et incubé pendant 30 minutes à température pièce. Les lames sont ensuite rincées et le réactif de détection *Dako EnVision FLEX HRP* (dextrane couplé à des molécules de peroxydase et de molécules d'anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin). Puis, un chromogène *EnVision FLEX DAB* (diaminobenzidine contenant du peroxyde d'hydrogène). Enfin, une contre coloration par l'hématoxyline *EnVision FLEX Hematoxylin* a été effectuée.

XII. QUANTIFICATION

Toutes les lames ont été quantifiées à l'aide d'un nanozoomer (*Hamamatsu Photonics*, Shizuoka, Japan). Les images ont été traitées par *NDP. View 2* et *Paint.net*. La quantification des colorations (*Picro Sirius Red* et *Anti-caspase-3 active*) a été faite avec *Image J* (*Wayne Rasband*, NIH, USA).

XIII. TESTS STATISTIQUES

L'analyse statistique de l'étude de survie Kaplan-Meier a été testée avec un Mantel-Cox. La comparaison entre les résultats des 2 souches de souris a été présentée sous forme de la moyenne \pm S.E.M. Un *t test* de Student, un one-way ANOVA ou un two-ways ANOVA ont été effectués à l'aide du logiciel *GraphPad InStat 3.0* (*GraphPad Software*, La Jolla, CA).

RÉSULTATS

I. ANALYSE DE SURVIE KAPLAN-MEIER

1. COURBE DE SURVIE

L'étude de survie Kaplan-Meier a été effectuée chez des souris infarctées des 2 souches *WT* et *mMCP-4KO* pendant 7 jours. En effet, 19 souris de la souche sauvage et 20 souris de la souche réprimée en chymase mastocytaire de type 4 ont eu un infarctus du myocarde au jour zéro et ont été suivies. Le jour du décès d'une souris a été noté. Une autopsie a été effectuée et la cause de mortalité a été identifiée et notée. À la fin de la période de surveillance, les souris survivantes ont été euthanasiées. Un prélèvement de plasma, du cœur, des poumons et du tibia gauche a été réalisé. Les souris ayant une taille réduite de l'infarctus ont été éliminées (<2/3 de la paroi ventriculaire gauche et n'atteignant pas l'apex cardiaque).

Aucune mortalité ne fut observée durant les 3 premiers jours. Le début et le maximum en termes de mortalité ont été observés vers le 4^{ème} jour post-infarctus dans les 2 souches avec perte de 26.32% dans les *WT* et 10% dans les *KO*. Au jour 5, 15.79 % sont décédées dans les *WT* et 5% dans les *KO*. À partir du jour 6, aucune mortalité n'a été enregistrée dans la souche *KO*, tandis que dans les *WT*, 5.3% ont été perdues le jour 6 et 5.3% le jour 7.

Au total, à la fin de la période de suivi, le taux de mortalité dans la souche *WT* dépasse la moitié (53%) tandis que celui de la souche *KO* est de 15%. La différence entre les 2 courbes est significative à 7 jours post-infarctus (**figure 8**).

2. CAUSES DE MORTALITÉ

Les causes de mortalité identifiées à l'autopsie sont représentées dans la **figure 9 A**. La principale a été la rupture cardiaque (47 % dans les *WT* et 15% dans les *mMCP-4KO*) identifiée par la découverte de sang dans la cage thoracique. La zone de rupture cardiaque a été localisée au niveau de la région nécrosée (**Figure 9 B**). La 2^{ème} cause identifiée a été l'insuffisance cardiaque chez les souris *WT* dans 5% des cas. Cette observation a été retenue en la présence de liquide séreux au niveau de la cage thoracique et de la cavité péritonéale.

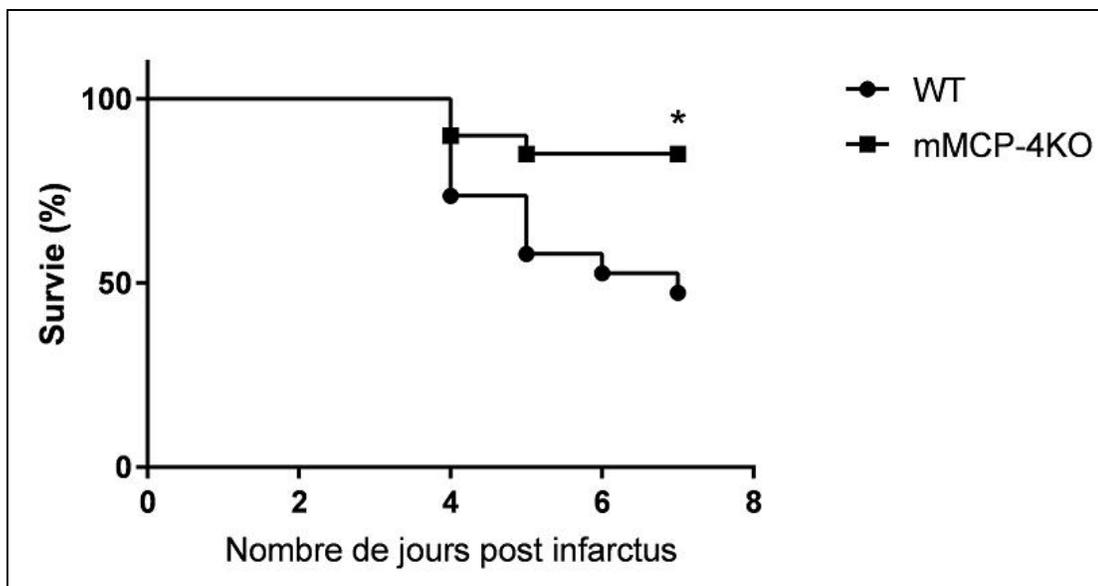


Figure 8: Analyse de survie Kaplan-Meier sur 7 jours à la suite de la ligature de l'artère coronaire descendante antérieure gauche chez 19 souris *WT* et 20 souris *mMCP-4 KO*.

* $p < 0.05$

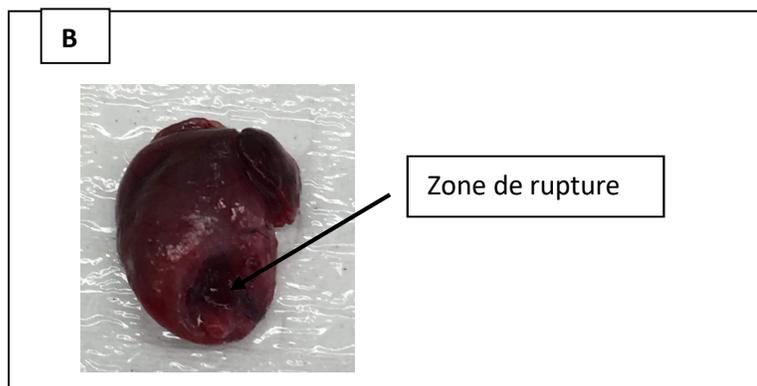
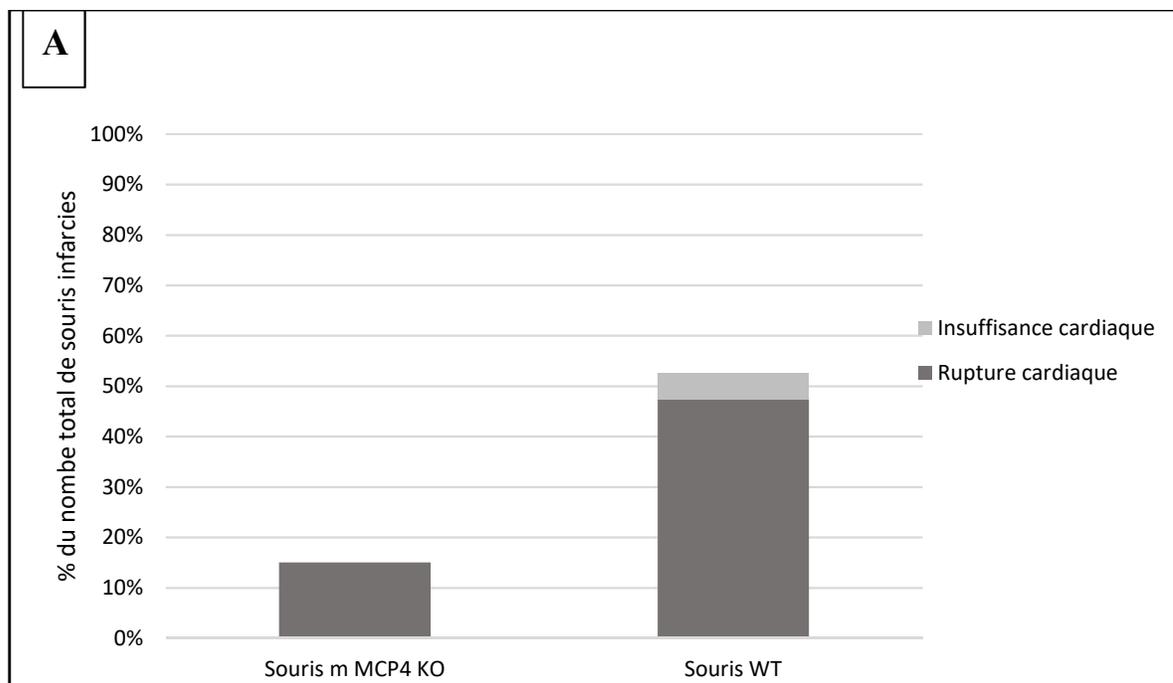


Figure 9 : Mortalité au cours de la période de suivi :

A : Causes de mortalité des souris *WT* et *mMCP-4KO* durant la période de suivi (7 jours)

B : Zone de rupture dans un cœur infarcté de 4 jours d'une souris *mMCP-4KO*.

3. VARIATION DU POIDS DU CŒUR POST-INFARCTUS

Le cœur des souris a été pesé à chaque prélèvement même chez les souris décédées. Un rapport entre le poids du cœur et la longueur du tibia gauche a été établi afin d'étudier sa variation entre les 2 souches et, entre les souris ayant survécu ou décédé de chaque souche de souris (**figure 10A**).

Dans le groupe de souris infarctées, le ratio du poids du cœur /taille du tibia gauche n'a pas changé ni entre les 2 souches de souris ni entre souris décédées et survivantes de la même souche (poids du cœur/taille du tibia gauche en mg/mm dans les souris survivantes *WT* :8.86, dans les souris décédées *WT* : 9.52, dans les souris *mMCP-4KO* survivantes : 9.67 et dans les souris *mMCP-4KO* décédées : 9.57). Par ailleurs, ce ratio est augmenté de façon significative dans les souris infarctées comparées aux shams de 7 jours dans les 2 souches de souris ayant survécu à l'infarctus. Ce ratio est aussi augmenté dans les cœurs de souris *WT* et *KO* décédées comparativement aux shams.

4. VARIATION DU POIDS DES POUMONS POST-INFARCTUS

Le poids des poumons de souris a été noté à chaque prélèvement fait à 7 jours post-infarctus du myocarde des souris *WT* et *mMCP-4KO*. Un rapport entre le poids des poumons et la longueur du tibia gauche a été établi pour identifier une variation morphologique entre les 2 souches au terme de 7 jours de survie (**figure 10 B**).

Le ratio du poids des poumons /taille du tibia gauche n'a pas varié entre les 2 souches après une survie de 7 jours post-infarctus du myocarde (poids des poumons/taille du tibia gauche en mg/mm dans les souris *WT* : 9.65 dans les souris *mMCP-4KO* : 10.3.

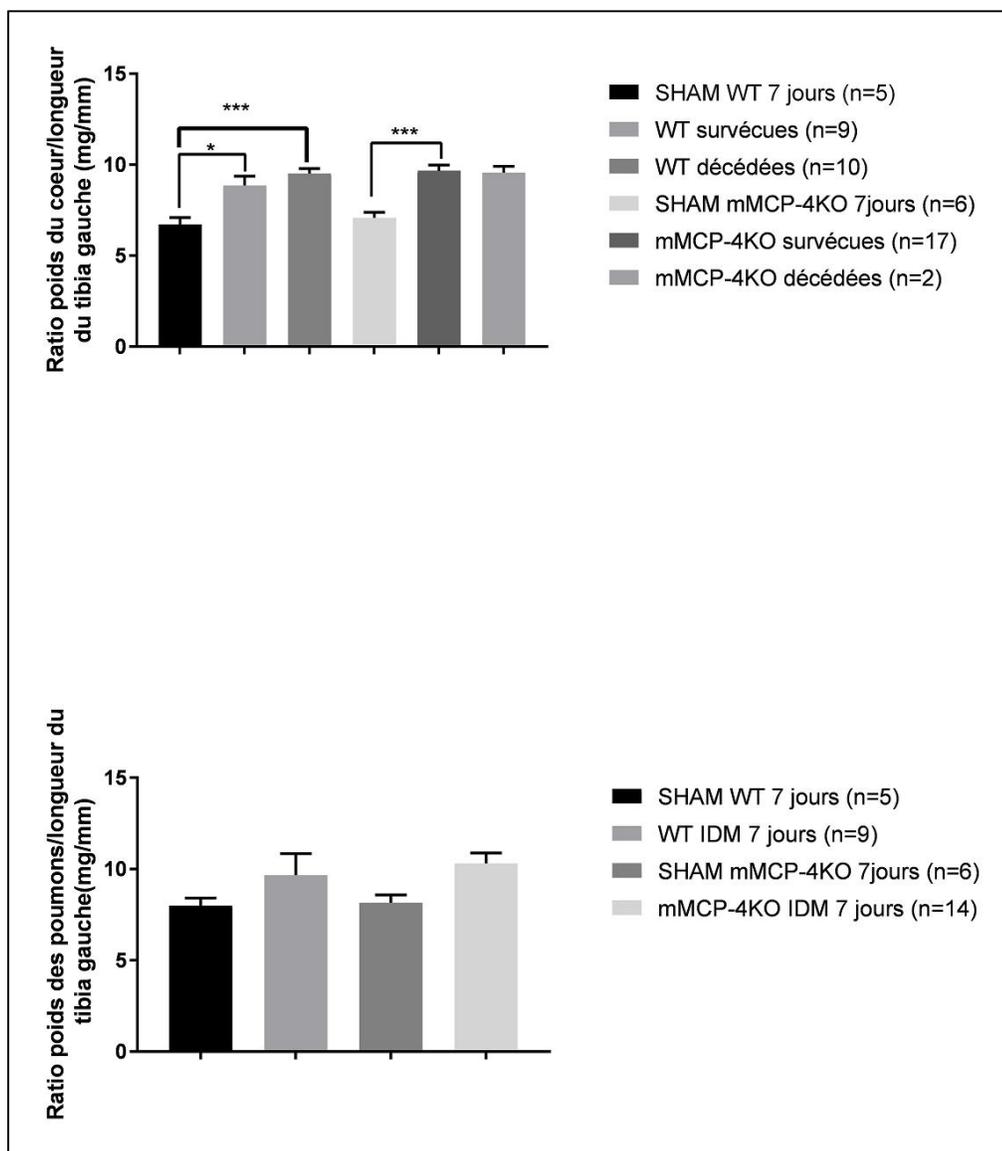


Figure 10: Variation des poids du cœur et des poumons en post-IDM :

A) Variation du poids du cœur post-infarctus dans les souris infarctées et SHAM de 7 jours *WT* et *KO*: étude du ratio poids du cœur de souris (mg)/longueur du tibia gauche (mm) dans les souris *WT* et *KO* prélevées à 7 jours et décédées (dates de décès confondues).

B) Variation du poids des poumons post-infarctus du myocarde dans les souris infarctées (ayant survécu) et SHAM de 7 jours *WT* et *KO* : Ratio poids des poumons (mg)/longueur du tibia (mm).

II. DOSAGE DU BNP PLASMATIQUE

Le BNP a été évalué au niveau du plasma des souris infarcies et shams aux différents temps de 1, 3 et 7 jours en plus des souris saines des mêmes souches (*WT* et *mMCP-4 KO*) (**Figure 11**).

Le taux de BNP des souris saines est comparable entre les souris *WT* et les souris *KO*. Dans la souche de souris *WT*, il y a une augmentation significative de la concentration de BNP dans le plasma des souris shams de 1 jour, infarcies de 1 jour, shams de 3 jours et infarcies de 3 jours par rapport aux souris saines *WT*. Ce taux ne varie pas de façon importante entre 1 et 3 jours post-opératoires. Par ailleurs, il y a une baisse significative de la concentration de BNP dans les plasmas de souris shams 7 jours comparées aux shams de 1 et 3 jours. De plus, le taux plasmatique de BNP chez les infarcies de 7 jours est significativement plus bas que celui des infarcies de 1 jour et de 3 jours.

Dans la souche de souris *mMCP-4KO*, il y a une augmentation significative du taux de BNP plasmatique dans les souris shams de 1 jour, infarcies de 1 jour, les shams de 3 jours, et les infarcies de 3 jours comparées aux souris saines *mMCP-4KO*. Ce taux ne varie pas de façon importante entre 1 et 3 jours post-opératoires. Par ailleurs, il y a une baisse significative de la concentration plasmatique de BNP dans les infarcies de 7 jours comparées aux infarcies de 1 jour et aux infarcies de 3 jours dans les 2 souches de souris.

Au total, il n'y a pas de différence du taux plasmatique de BNP basal dans les 2 souches de souris. L'augmentation du taux de BNP se voit aussi bien chez les infarcies que les shams dans les 2 souches de souris à 1 et 3 jours post-opératoires. À 7 jours d'évolution, les taux de BNP baissent parallèlement dans les 2 souches de souris.

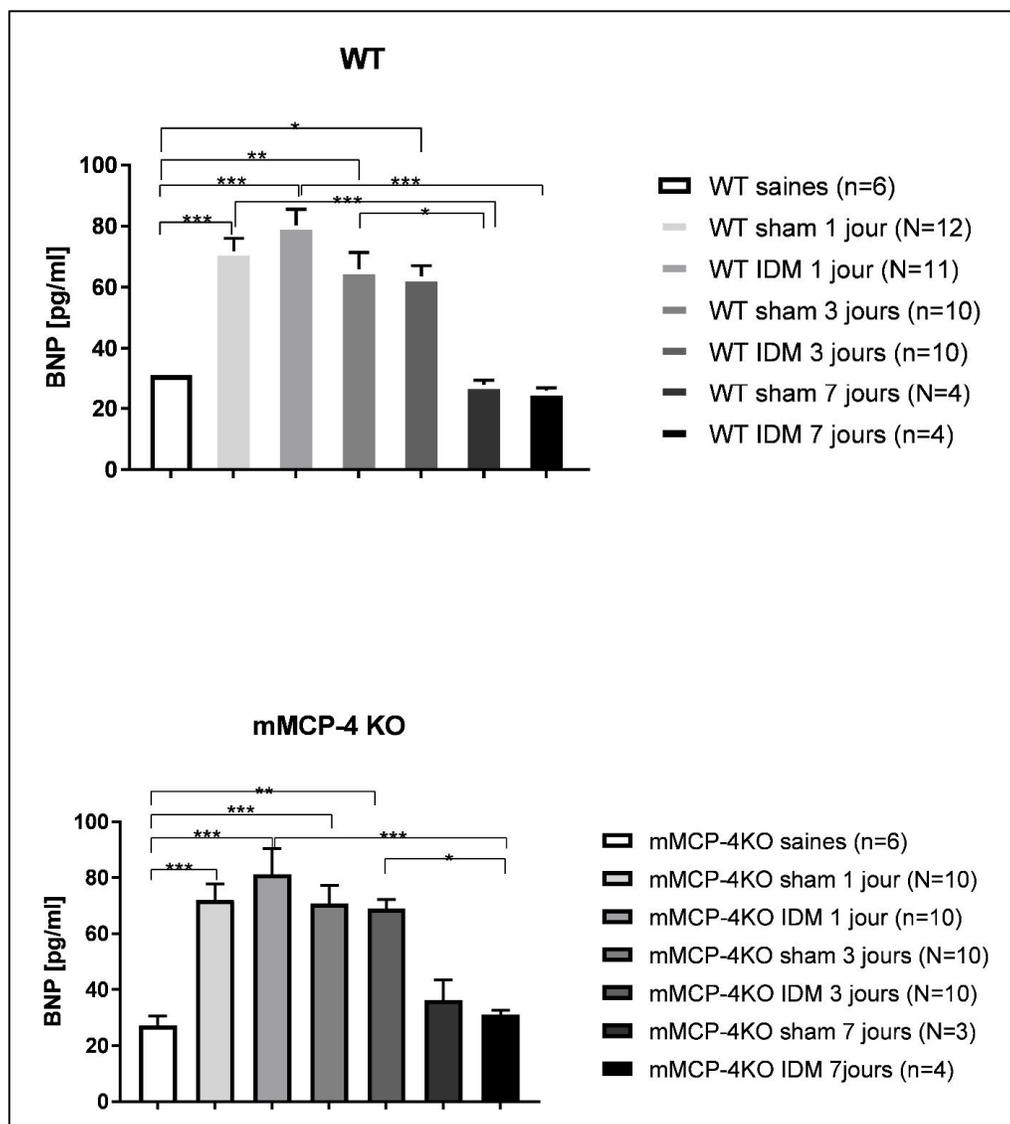


Figure 11 : Quantification du taux de BNP plasmatique chez les souris *WT* et *mMCP-4 KO*, saines, infarctées et shams de 1, 3 et 7 jours post-opératoires. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, et *** $p < 0.001$.

III. QUANTIFICATION DE L'INVASION MASTOCYTAIRE CARDIAQUE

1. ASPECT MICROSCOPIQUE DES MASTOCYTES CARDIAQUES

Les mastocytes cardiaques sont mis en évidence grâce à la coloration au bleu de Toluidine qui colore principalement les granules intra cytoplasmiques en bleu violacé (**figure 12**). En revanche, cette coloration n'est pas spécifique à ce type de cellule car elle colore, en plus, les constituants cellulaires acides. Cette coloration a une forte affinité pour les acides nucléiques (ADN et ARN) (Sridharan and Shankar, 2012).

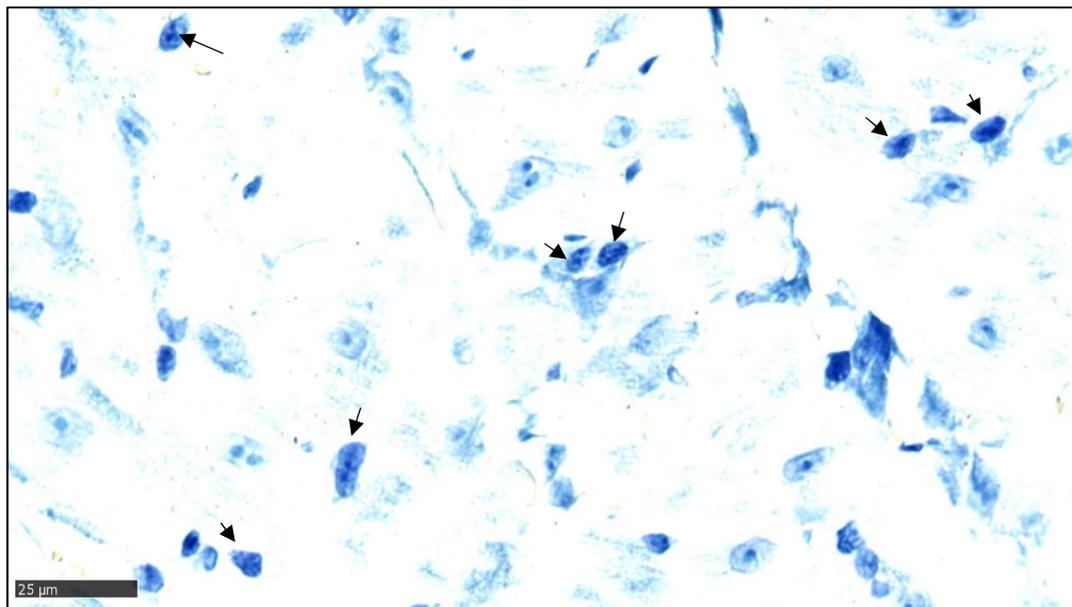


Figure 12 : Mastocytes (flèches) au niveau du tissu cardiaque coloré au bleu de Toluidine d'une souris *mMCP-4KO* infarctée de 3 jours : cellules de coloration bleu violacé et aspect granulé du cytoplasme.

2. ASPECT ET QUANTIFICATION DES MASTOCYTES AU NIVEAU DES COUPES CARDIAQUES COLORÉES AU BLEU DE TOLUIDINE

L'aspect macroscopique des coupes des cœurs, colorées au bleu de Toluidine, infarcis et shams de 1, 3 et 7 jours est présenté dans la **figure 13**. La quantification de cette coloration au niveau de toute la section cardiaque (en excluant les cavités) est proportionnelle au nombre de mastocytes mais de façon non spécifique (**figure 14 A**). Le nombre de mastocytes comptabilisés au niveau de la zone péri infarcie varie en fonction de l'âge de l'infarctus et de la souche de souris (**figure 14 B**).

À 1 jour post-infarctus, les coupes de cœurs semblent prendre la coloration bleue à l'exception de la zone infarcie qui semble être plus claire et prendre moins de coloration, tandis que les coupes des cœurs shams semblent prendre la coloration de façon homogène sur toute la coupe dans les 2 souches de souris *WT* et *mMCP-4KO*. La quantification de la coloration au niveau de la coupe du tissu cardiaque, ainsi que le décompte des mastocytes au niveau de la zone péri-infarctie montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre *WT* et *mMCP-4KO*.

À 3 jours post-infarctus, dans la souche de souris *WT*, les coupes des cœurs semblent prendre plus de couleur bleue au niveau de la zone non-infarctie. La zone infarcie apparaît plus claire par rapport à son équivalent à 1 jour post-infarctus. Les coupes des cœurs des souris shams de 3 jours semblent avoir des petites zones plutôt périphériques où la densité de coloration semble augmentée. Ces zones coïncideraient avec les régions de manipulation du cœur avec les pinces et le passage du fil. Ces mêmes aspects sont retrouvés dans les coupes de cœurs infarcis et shams dans la souche de souris *mMCP-4KO*. À la quantification de coloration, il y a une augmentation significative dans les cœurs de souris *WT* par rapport aux cœurs de *WT* de 1 jour. De plus, il y a une augmentation significative de la coloration dans les cœurs de *WT* comparés aux cœurs de souris *mMCP-4K*. En revanche, le nombre de mastocytes ne varie pas de façon significative entre 1 et 3 jours post-IDM et entre les 2 souches.

À 7 jours post-infarctus, dans la souche de souris *WT*, la densité du bleu est très marquée au niveau de la zone de l'infarctus qui semble très rétrécie par rapport aux shams de la même date. La même répartition de bleu est retrouvée dans les coupes de cœurs

infarctés et sham dans la souche de souris *mMCP-4KO* dont la paroi libre du ventricule gauche semble plus épaisse par rapport à celle des cœurs des souris *WT*. Il y a une augmentation significative de la coloration dans les cœurs de souris *WT* comparés à celle trouvée à 3 et à 1 jour post-infarctus. En outre, il y a une grande différence entre les cœurs des souris des 2 souches à ce temps post-IDM. En effet, il existe plus de coloration dans les cœurs de souris *WT* comparés aux *KO*. Le nombre de mastocytes augmente de façon significative dans la souche *WT* comparé à 1 et 3 jours post-IDM. Parallèlement à la souche *WT*, le nombre de mastocytes dans la souche *KO*, augmente de façon significative par rapport à celui trouvé à 1 et 3 jours post-IDM. Cette augmentation est plus importante au niveau de la zone péri-infarctée des souris *WT* comparativement aux *KO*.

Au total, il existe une augmentation de la coloration bleue au niveau de la section cardiaque proportionnellement à l'âge de l'infarctus de façon significative dans la souche *WT*. Dans la souche *KO*, cette quantification ne varie pas de façon significative. En plus, il existe une augmentation significative de leur nombre dans les *WT* comparés aux *KO* à 3 et 7 jours post-infarctus.

Au niveau de la zone péri-infarctée, le nombre de mastocytes augmente après un infarctus du myocarde de 7 jours dans les 2 souches, mais, de façon plus importante chez les souris *WT*.

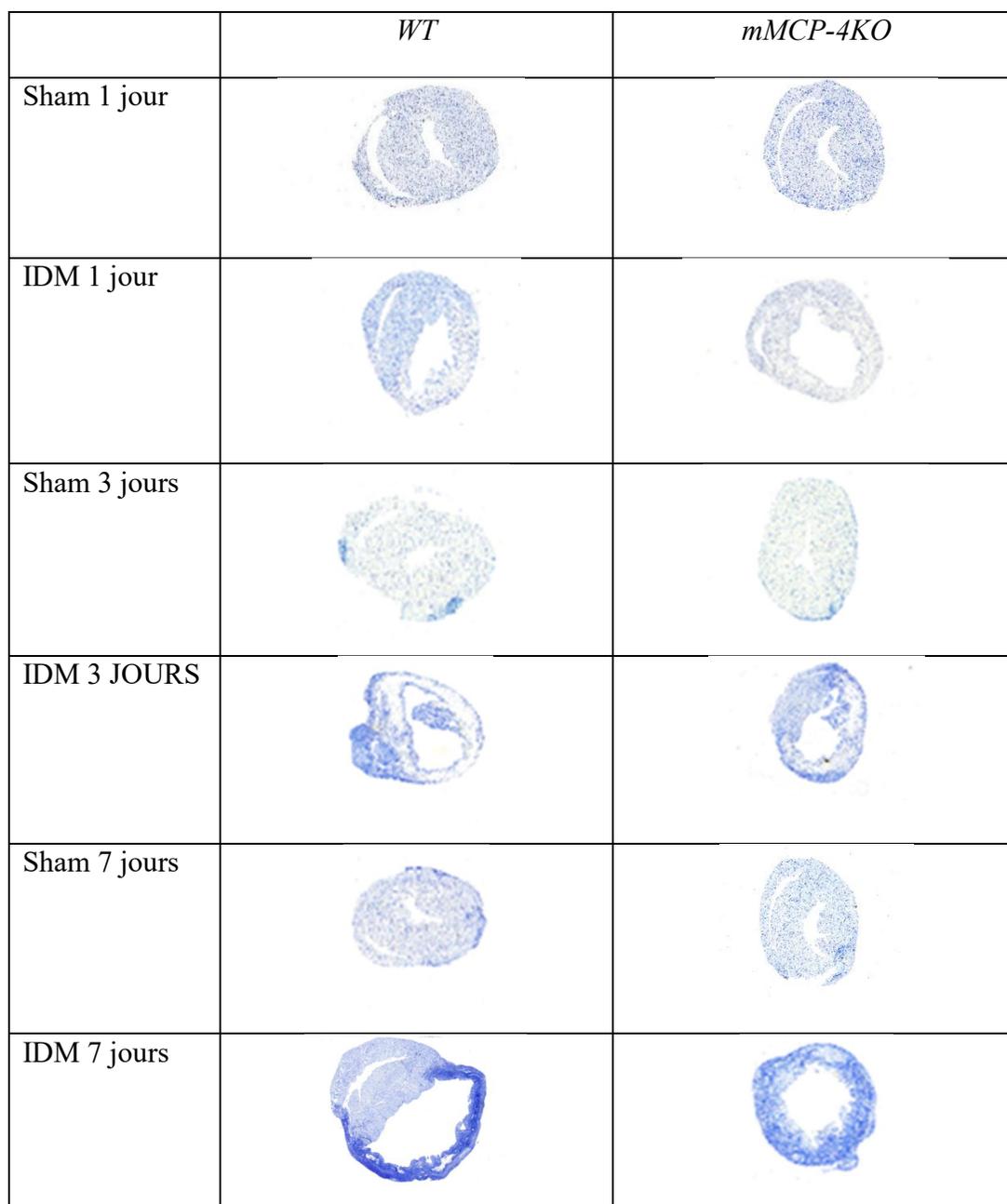


Figure 13 : Aspect macroscopique des coupes de cœurs de souris shams et infarctées de 1, 3 et 7 jours colorés au bleu de Toluidine.

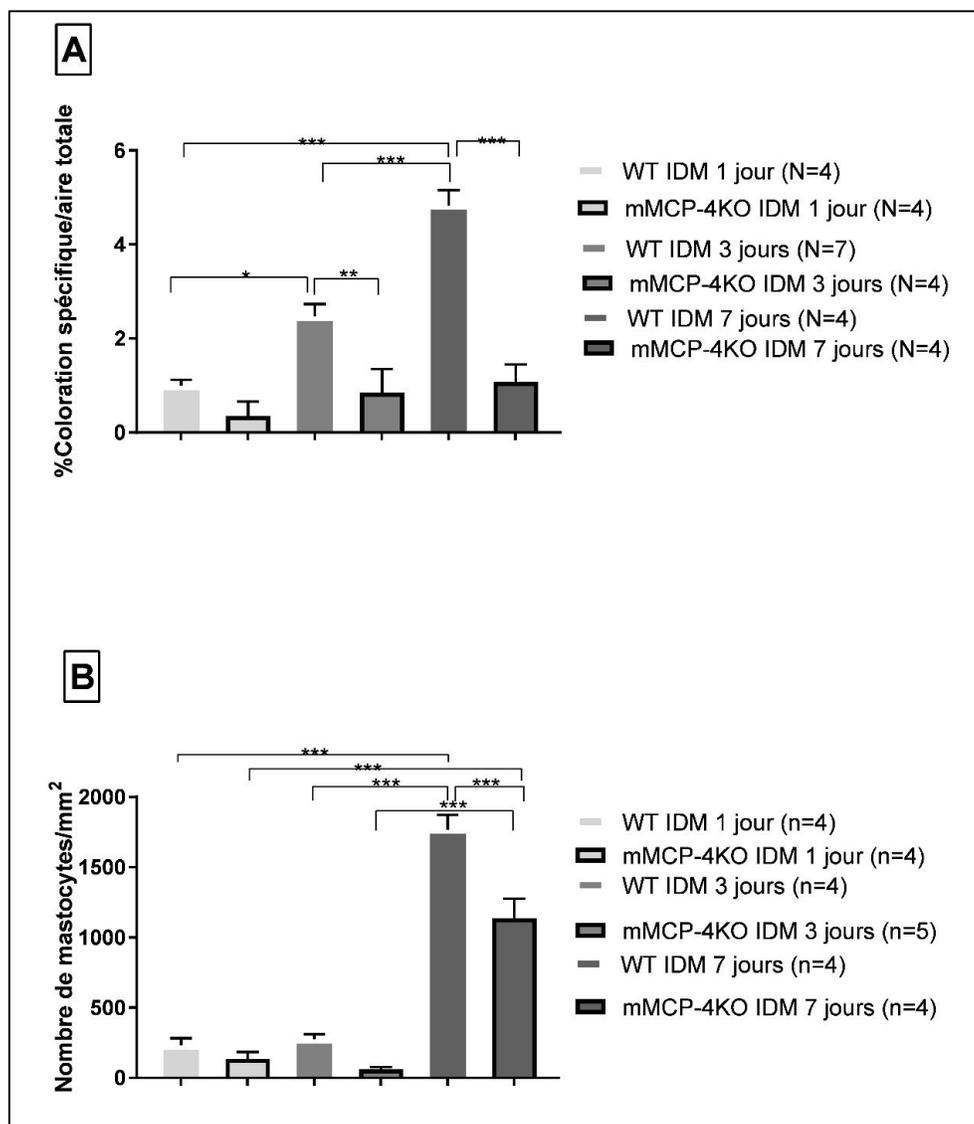


Figure 14 : Quantification des mastocytes cardiaques en post-IDM

A) Quantification de la coloration bleue de Toluidine au niveau de la portion apicale de la section transversale de cœurs infarcis de souris *WT* et *mMCP-4KO* de 1, 3 et 7 jours corrigés par rapport aux shams de la même date;

B) Décompte des mastocytes/mm² au niveau de la zone péri-infarctie de la portion apicale de la section transversale de cœurs infarcis de souris *WT* et *mMCP-4KO* de 1, 3 et 7 jours corrigés par rapport aux shams de la même date. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

IV. QUANTIFICATION DE LA FIBROSE MYOCARDIQUE POST-INFARCTUS

1. ASPECT MICROSCOPIQUE DE LA FIBROSE MYOCARDIQUE :

La présence de dépôt de collagène de type I et III signant la fibrose myocardique a été mise en évidence grâce à la coloration au *Picro Sirius Red* des coupes de cœurs infarctés de 1, 3 et 7 jours comparés aux shams d'âges équivalents. Un exemple de l'aspect microscopique de la fibrose myocardique est représenté dans la **figure 15**.

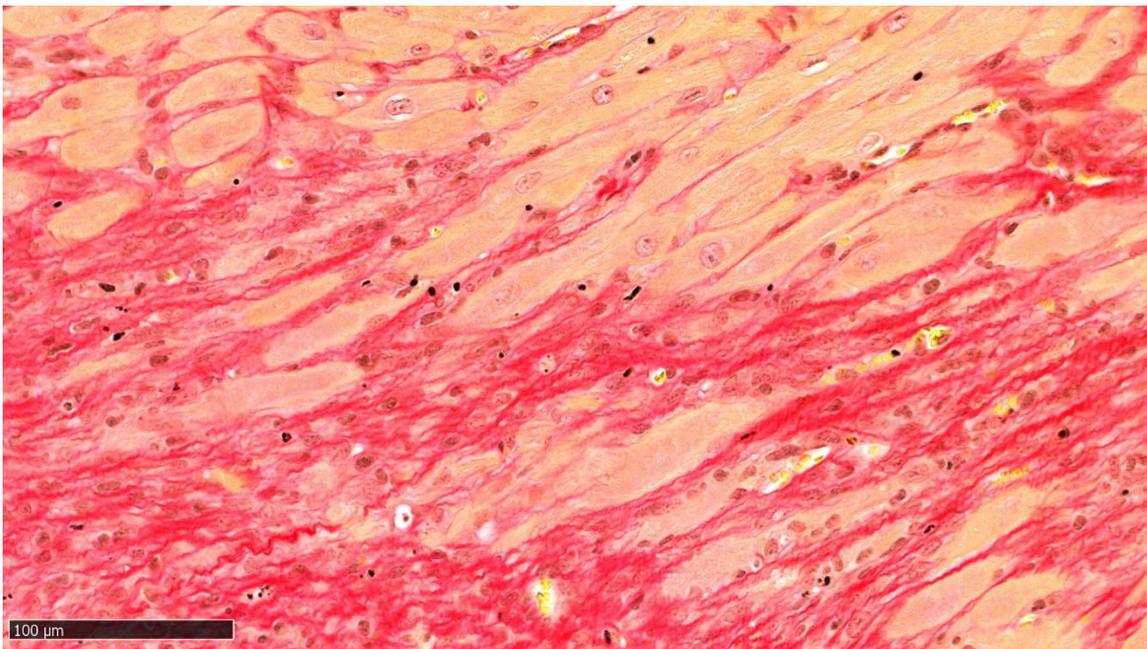


Figure 15 : Travées de collagène, sur une coupe de cœur de souris infarctée *WT* de 3 jours colorées en rouge, au *Picro Sirius Red*, et déposées dans l'espace inter-cellulaire, le cytoplasme cellulaire paraît en orange.

2. ASPECT MACROSCOPIQUE DES COUPES DES CŒURS COLORÉES AU *PICRO SIRIUS RED* ET QUANTIFICATION DU COLLAGÈNE

L'aspect macroscopique des coupes des cœurs, colorées au *Picro Sirius Red*, dérivées de souris infarcis et shams de 1,3 et 7 jours est représenté dans la **figure 16**. La quantité de collagène au niveau des cœurs infarcis corrigée par rapport à celle retrouvée dans les cœurs de souris shams de la même date est présentée dans la **figure 17**.

À 1 jour post-opératoire, dans les 2 souches de souris, les coupes de cœurs ne prennent pas la coloration rouge. La quantité de collagène dans les coupes est négligeable dans les 2 souches de souris *WT* et *KO*.

À 3 jours post-infarctus, dans la souche de souris *WT*, les coupes des cœurs semblent avoir plus de coloration rouge au niveau de la zone infarctée (plus visible sur un plus fort grossissement, variation de la coloration des coupes à 3 jours est dû à des variations inter essais). Les coupes des cœurs des souris shams de 3 jours montrent des petites zones plutôt périphériques où la densité de coloration semble augmentée. Ces zones coïncident avec les régions de manipulation du cœur avec les pinces et le passage du fil. Le même aspect est retrouvé dans les coupes de cœurs infarcis et shams dans la souche de souris *mMCP-4KO*. Le collagène commence à se déposer de façon plus significative au niveau des coupes des cœurs de souris *KO* par rapport à ceux des *WT* de 3 jours. De plus, il y a une augmentation significative de la quantité de collagène dans les coupes de cœurs *KO* à 3 jours par rapport à celle observée dans un infarctus de 1 jour dans la même souche. Cette augmentation ne se voit pas dans la souche *WT*.

À 7 jours post-infarctus, dans la souche de souris *WT*, la densité du rouge est très marquée au niveau de la zone de l'infarctus qui semble très rétrécie par rapport aux shams de la même date. La même répartition de rouge est retrouvée dans les coupes de cœurs infarcis et shams dans la souche de souris *mMCP-4KO*. La quantité de collagène augmente de façon significative dans les 2 souches de souris *WT* et *KO* par rapport à celle observée à 3 jours et à 1 jour. De plus, le niveau de collagène est significativement plus élevé dans les coupes de cœurs de souris *KO* par rapport aux *WT*.

Au total, il y a une augmentation de la quantité de collagène au niveau des coupes des cœurs de souris proportionnellement à l'âge de l'infarctus dans les 2 souches de souris mais de façon plus importante chez les souris *mMCP-4KO*.

	<i>WT</i>	<i>mMCP-4KO</i>
Sham 1 jour		
IDM 1 jour		
Sham 3 jours		
IDM 3 jours		
Sham 7 jours		
IDM 7 jours		

Figure 16 : Aspect macroscopique des coupes de cœurs infarcis et shams à 1, 3 et 7 jours post-opératoires colorés au *Picro Sirius Red*.

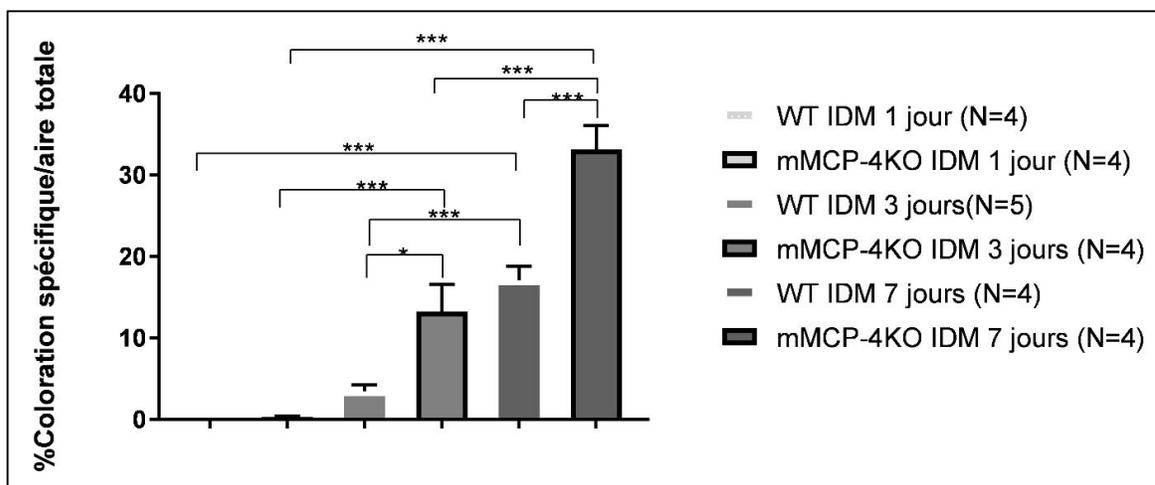


Figure 17 : Quantification du collagène au niveau de la portion apicale de la coupe transversale de cœurs infarcis, résultat corrigé par rapport aux shams.

V. ÉTUDE DE L'APOPTOSE AU NIVEAU DES COUPES DE CŒURS INFARCIS

1. ASPECT MICROSCOPIQUE DES CELLULES APOPTOTIQUES AU NIVEAU DU MYOCARDE :

Grâce à l'immunomarquage par l'anticorps anti-caspase-3 active, nous avons mis en évidence des cellules apoptotiques au sein des coupes de tissus cardiaques. Le marquage prend la coloration brune. Un exemple est montré dans la **figure 18**.

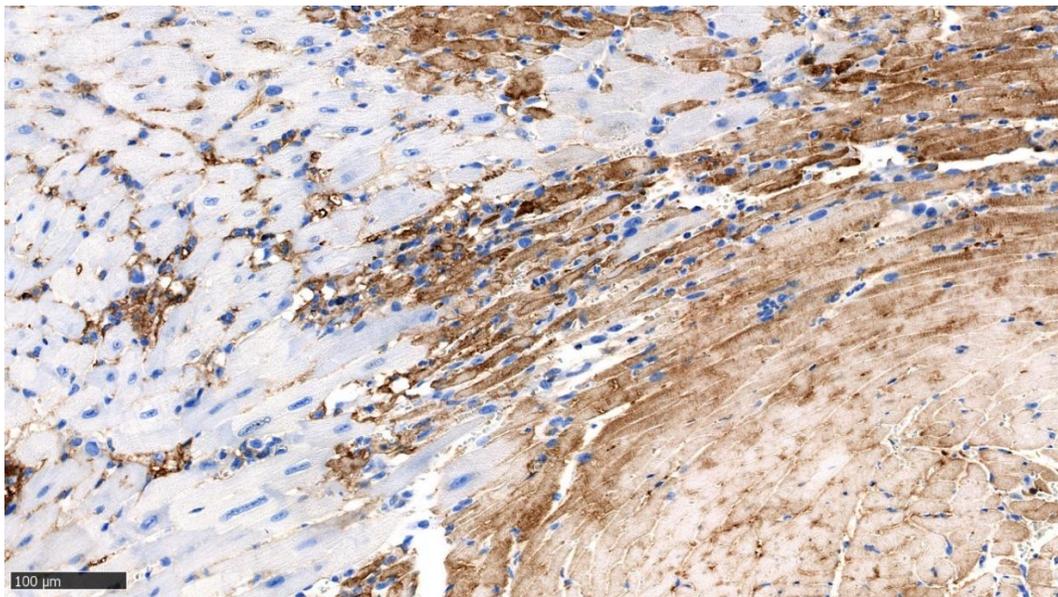


Figure 18 : Aspect microscopique des cellules apoptotiques marquées en brun par un anticorps anti-caspase 3 active au niveau d'une zone de jonction myocarde infarcté-myocarde péri lésionnel sur une coupe de cœur infarcté de souris *WT* de 3 jours

2. ASPECT MACROSCOPIQUE DES COUPES DE CŒURS MARQUÉS À L'ANTICORPS ANTI-CASPASE-3 ACTIVE ET QUANTIFICATION DE L'APOPTOSE

La présence de la coloration brune est en rapport avec la fixation de l'anticorps anti-caspase-3 active au niveau des coupes étudiées. À 1 jour post-infarctus, la fixation du marqueur de l'apoptose est non-délectable dans les coupes des cœurs des 2 souches de souris *WT* et *KO*.

Dans un cœur infarci de 3 jours, une hyperfixation de cet anticorps au niveau de la zone infarctée des cœurs *WT* et *KO* a été notée. La zone apoptotique siège au niveau de la totalité de la paroi libre du ventricule gauche dans les 2 souches de souris. Dans les cœurs des souris shams de 3 jours, des zones apoptotiques superficielles sont présentes qui seraient en rapport avec des lésions dues à la manipulation opératoire des cœurs et le passage du fil pour créer les shams dans les 2 souches. À la quantification de la coloration, la fixation de l'anticorps anti-caspase-3 active augmente significativement dans les 2 souches de souris comparée à son niveau à 1 jour. De plus, il y a une différence importante entre les 2 souches à 3 jours post-infarctus. En effet, il y a beaucoup plus d'apoptose au niveau des coupes des cœurs *WT* comparés aux *KO*.

Dans un cœur infarci de 7 jours, il existe moins de fixation de l'anticorps dans la zone infarctée dans les coupes de cœurs *WT* et *KO* comparées à la densité de la coloration à 3 jours. Il semble y avoir plus d'apoptose dans les cœurs infarcis *KO* comparativement aux *WT* de 7 jours. Dans les shams de 7 jours, il n'y a pas de fixation importante de ce marqueur. À la quantification, il y a une baisse significative de la fixation de cet anticorps par rapport aux niveaux enregistrés à 3 jours dans les 2 souches de souris.

Au total, l'apoptose a été plus marquée au jour 3 post-infarctus comparé aux jours 1 et 7. Elle est significativement plus importante dans les cœurs de souris *WT* comparés aux *KO* (**figure 19 et 20**).



Figure 19 : Aspect macroscopique des coupes de cœurs infarctés et shams de 1, 3 et 7 jours marquées à l'anticorps anti-caspase-3 active montrant les zones apoptotiques en brun.

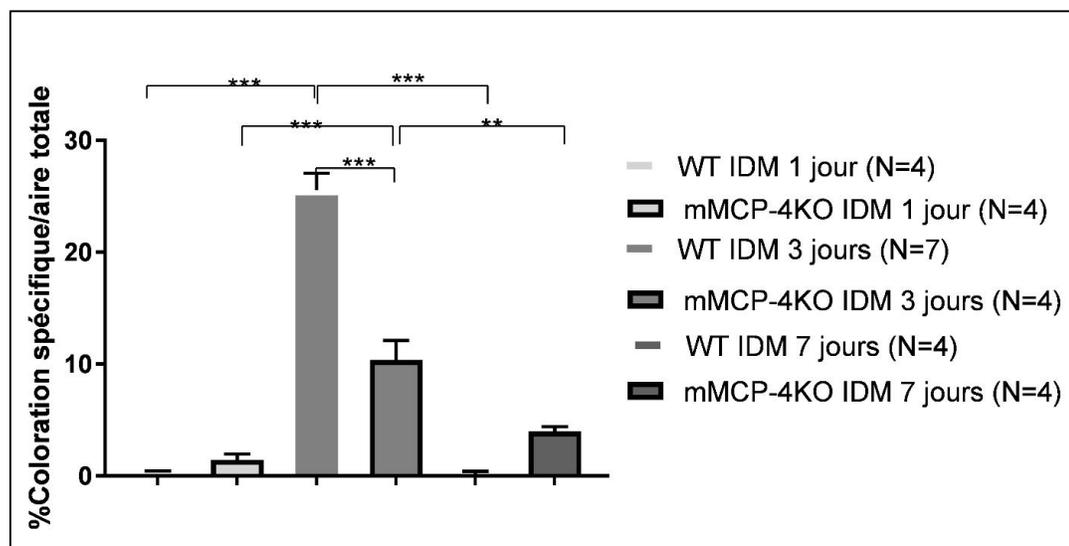


Figure 20 : Quantification de l'apoptose au niveau de la portion apicale de la section transversale de coupes cardiaques de souris infarcies de 1, 3 et 7 jours par immunomarquage de la caspase-3 active, résultat corrigé par rapport aux shams. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

VI. ÉTUDE DE L'ÉPAISSEUR MINIMALE DE LA PAROI CARDIAQUE VENTRICULAIRE GAUCHE

L'épaisseur minimale de la paroi ventriculaire gauche a été évaluée en la mesurant au niveau de la zone infarctée parce qu'elle est le siège du rétrécissement maximal de la paroi cardiaque (**figure 21**).

À 1 jour post-infarctus, on observe qu'il n'y a pas de différence dans l'épaisseur minimale de la paroi du ventricule gauche. À 3 jours postinfarctus, il existe une différence mais non-significative dans l'épaisseur minimale de la paroi ventriculaire gauche des cœurs de souris *WT* vs *KO*. À 7 jours post-infarctus, l'épaisseur minimale de la paroi ventriculaire gauche dans les cœurs de souris *WT* est significativement plus faible que celle des cœurs de souris *KO*. Comparativement aux shams, l'épaisseur minimale de la paroi ventriculaire des cœurs de souris infarciées *WT* et *KO*, après 1, 3 et 7 jours est significativement plus faible (résultat non présenté sur le graphique).

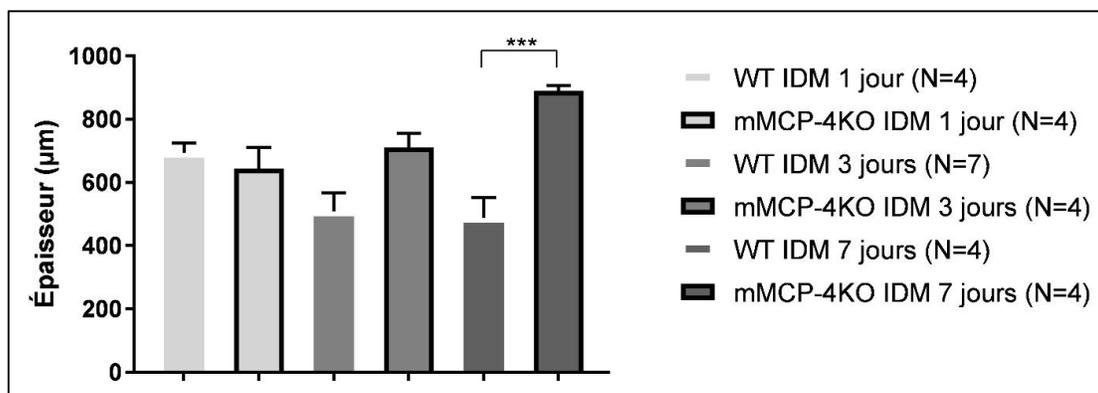


Figure 21 : Étude de l'épaisseur minimale de la paroi cardiaque ventriculaire gauche de souris infarctées *WT* et *KO* de 1, 3 et 7 jours. *** $p < 0.001$

VII. ÉTUDE DES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX

1. DÉCOMPTE MASTOCYTAIRE

À l'aide des lavages péritonéaux, les mastocytes contenus dans cette cavité sont extraits et comptés dans des souris infarctées et sham de 1, 3 et 7 jours post-opératoires dans les 2 souches de souris *WT* et *mMCP-4KO*. D'après le graphique de la **figure 22**, le nombre de mastocytes retrouvés dans les cavités péritonéales des souris *KO* et *WT*, ne varie pas significativement entre les 2 souches dans les différentes conditions expérimentales : sham et infarctus, à 1, 3 ou 7 jours post-opératoires.

Au total, il n'y a pas de différence dans le nombre de mastocytes péritonéaux entre sham et infarctés de 1, 3 et 7 jours post-infarctus au sein de la même souche ni entre les 2 souches de souris *WT* et *KO*.

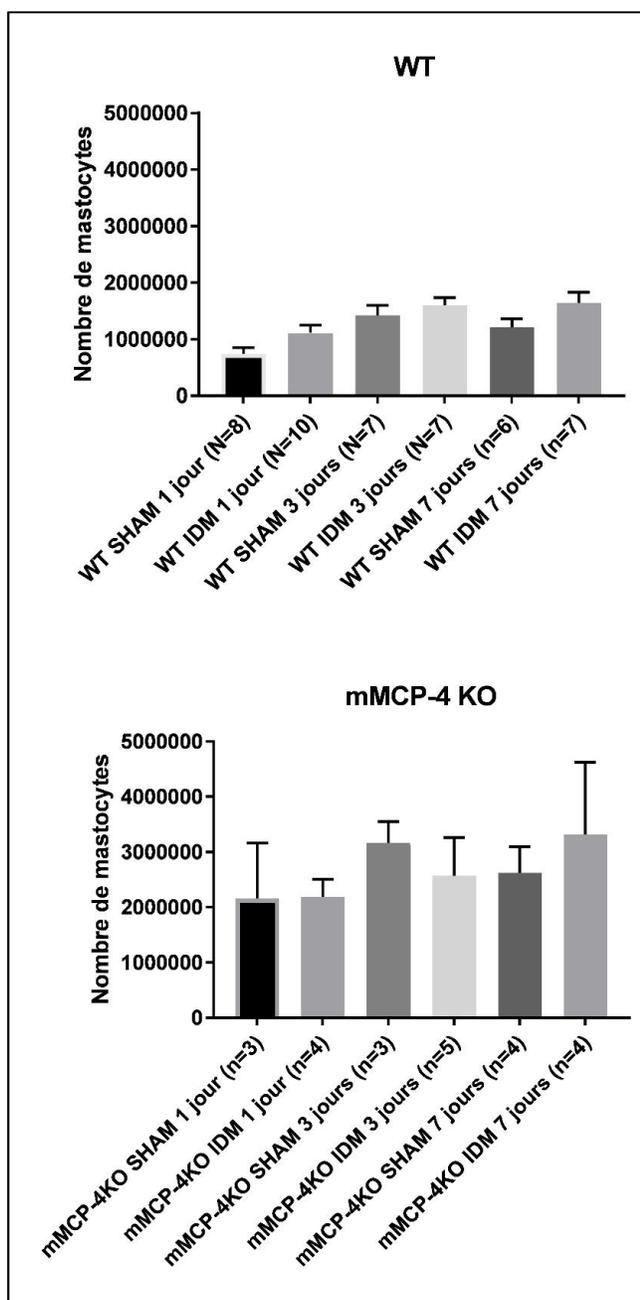


Figure 22 : Décompte des mastocytes péritonéaux recueillis par lavage péritonéal chez les souris *WT* et *mMCP-4KO* à la suite de chirurgies shams et infarcties de 1, 3 et 7 jours.

2. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

a. Souris *WT* :

Dans la souche de souris *WT* (**figure 23**), il existe une baisse significative de l'activité de type chymase mastocytaire dans les souris infarcies de 1 jour comparées aux souris shams de 1 jour. La divergence des 2 courbes de l'activité enzymatique des mastocytes péritonéaux de ces 2 conditions commence précocement à être significative dès 0.5 min du début de l'essai. Une différence d'environ 17200 UAF est observée à la fin de l'essai enzymatique.

À 3 jours post-opératoires, on n'observe pas cette différence entre les activités enzymatiques des mastocytes péritonéaux de souris shams et infarcies de 3 jours.

À 7 jours post-opératoires, les 2 courbes d'activité enzymatique mastocytaire des shams et des infarcies se superposent.

Au total, les mastocytes péritonéaux des souris *WT* infarcies de 1 jour présentent une activité chymasique réduite de façon significative par rapport aux shams de 1 jour. Cette différence régresse vers le 3^{ème} jour pour disparaître à 7 jours post-opératoires.

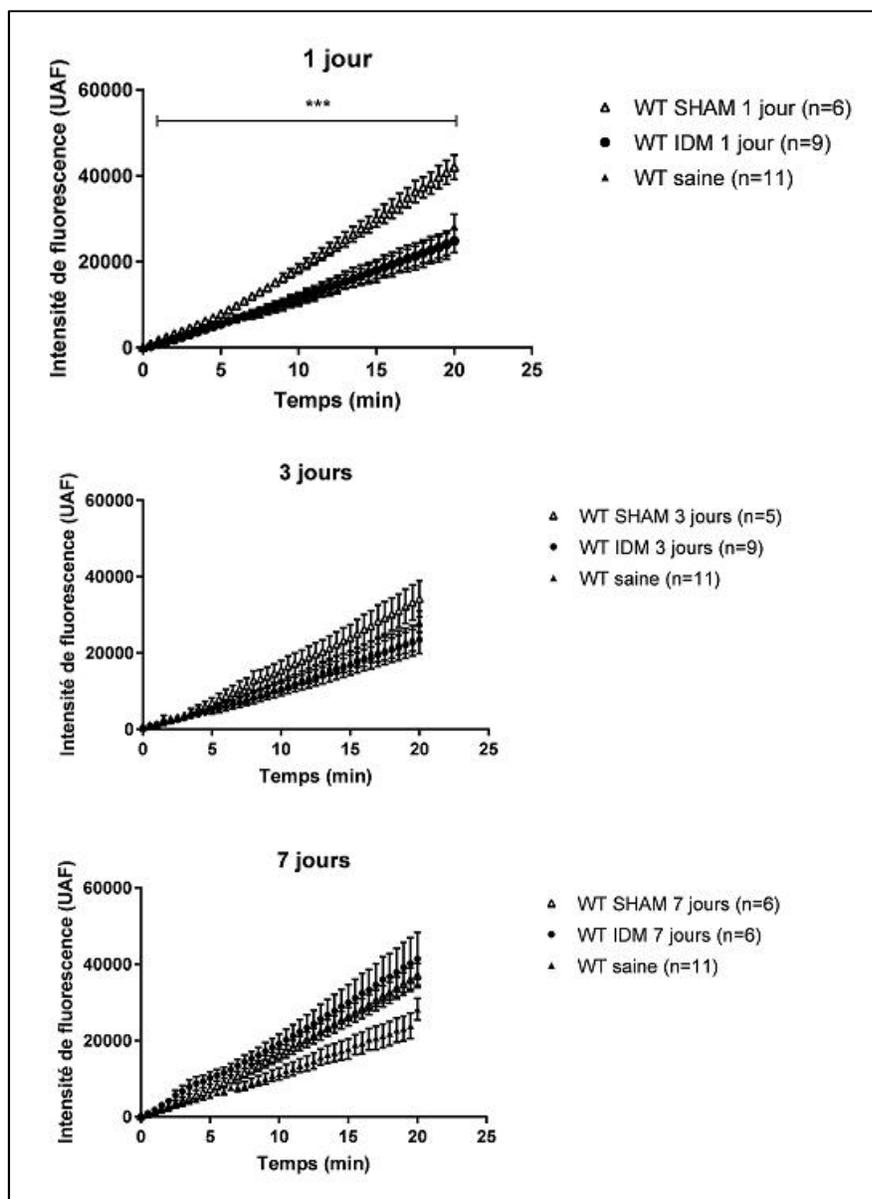


Figure 23 : Variation de la cinétique de l'activité chymase des mastocytes péritonéaux en présence d'un substrat fluorogénique chez les souris *WT* saines, sham et infarciées à 1, 3 et 7 jours post-opératoires. *** $p < 0.001$.

b. Souris mMCP-4KO

Dans les mastocytes péritonéaux des souris *mMCP-4KO*, il n'y a pas de différence entre sham et infarctés de point de vue activité enzymatique à un délai post-opératoire de 1, 3 et 7 jours. De plus, il n'y a pas de différence dans l'activité enzymatique en cas d'infarctus de 1 à 7 jours.

Au total, l'activité enzymatique faible (bruit de fond) des mastocytes péritonéaux des souris *KO* ne varie pas au cours des différentes conditions expérimentales : sham et IDM au différents temps post-infarctus (**figure 24**).

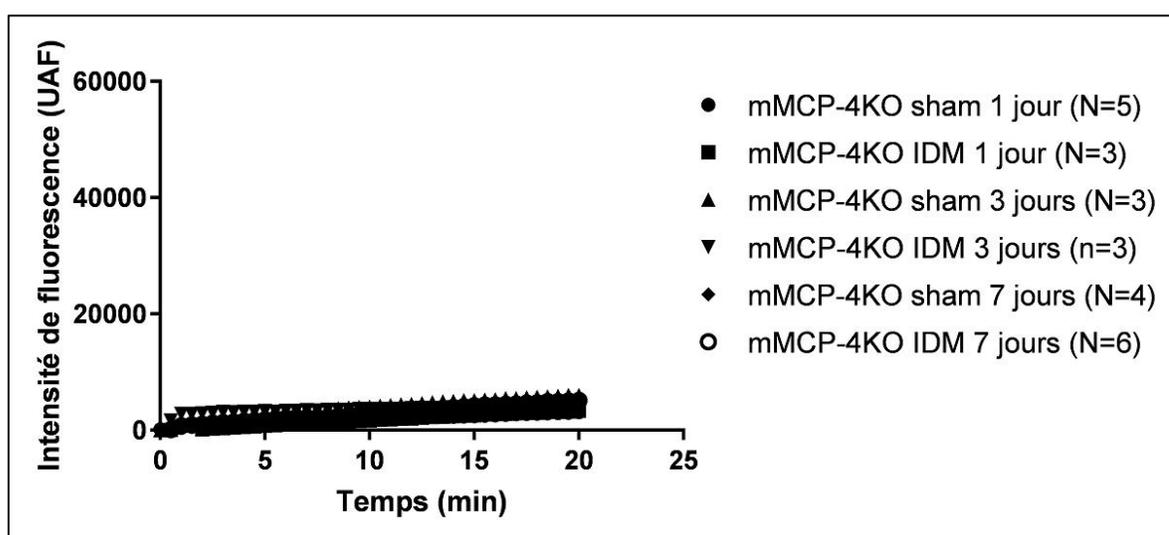


Figure 24 : Variation de la cinétique de l'activité chymase des mastocytes péritonéaux en présence d'un substrat fluorogénique chez les souris *ko* sham et infarctés à 1, 3 et 7 jours post-opératoires.

VIII. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS À L'ENDOTHÉLINE DANS LES POUMONS DE SOURIS

1. RÉCEPTEUR ET_A

a. Souris *WT*

Le niveau d'expression du récepteur ET_A de l'ET-1 au niveau du lobe supérieur du poumon gauche des souris *WT* infarcies (**figure 25 A**), ne varie pas à 1 et 3 jours post-infarctus comparativement aux shams durant les mêmes périodes. À 7 jours post-infarctus, on observe toutefois une augmentation très importante de l'expression de ce récepteur comparativement aux shams de 7 jours. De plus, cette augmentation à 7 jours est significative comparativement aux niveaux d'expression observés à 1 et 3 jours post-infarctus du myocarde.

Au total, à 1 et 3 jours post-infarctus les niveaux d'expression du récepteur ET_A ne varient pas comparés aux shams tandis qu'à 7 jours, ce niveau augmente de façon significative dans les infarcis comparés aux shams.

b. Souris *mMCP-4KO*

Le niveau d'expression du récepteur ET_A à l'ET-1 au niveau du lobe supérieur du poumon gauche des souris infarcies *mMCP-4KO* (**figure 25 B**), a été évalué seulement à 7 jours, étant donné que les niveaux d'expression de ce récepteur ne variaient pas dans les poumons de souris *WT* à 1 et 3 jours post-IDM (de même pour le récepteur ET_B).

À 7 jours post-infarctus, on observe qu'il n'y a pas de variation du niveau d'expression du récepteur ET_A dans les poumons de souris *mMCP-4KO* comparées aux souris shams de 7 jours.

2. RÉCEPTEUR ET_B

a. Souris *WT*

Le niveau d'expression du récepteur ET_B à l'ET-1 (**figure 25 C**) au niveau du lobe supérieur du poumon gauche des souris *WT* infarcies, ne varie pas à 1 et 3 jours post-infarctus comparativement aux shams de la même date. À 7 jours post-infarctus, on observe une augmentation importante de l'expression de ce récepteur comparativement aux shams de de

7 jours. De plus, cette augmentation à 7 jours est significative comparativement aux niveaux d'expression observés à 1 et 3 jours post-infarctus du myocarde.

Au total, à 1 et 3 jours post-infarctus les niveaux d'expression du récepteur ET_B ne varient pas comparés aux shams tandis qu'à 7 jours, ce niveau augmente de façon significative dans les infarcis comparés aux shams.

b. Souris mMCP-4KO

Le niveau d'expression du récepteur ET_B à l'ET-1 (**figure 25 D**) au niveau du lobe supérieur du poumon gauche des souris *mMCP-4KO* infarcies de 7 jours, ne varie pas comparé à celui des shams de 7 jours.

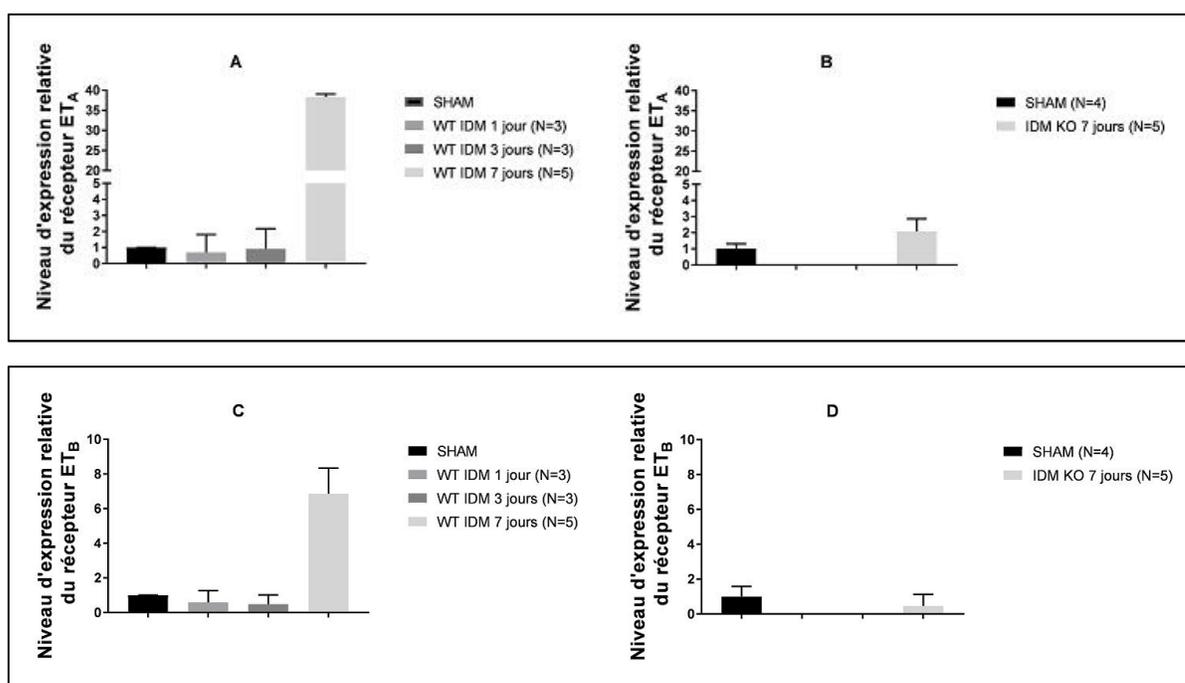


Figure 25 : Variation du niveau d'expression relative (par rapport à la bêta actine comme gène rapporteur) des récepteurs à l'ET-1 au niveau du lobe pulmonaire supérieur gauche de souris infarcies comparées aux shams correspondants en RT-qPCR:

*Récepteur ET_A : A) souris *WT* (1, 3 et 7 jours post-infarctus), B) souris *mMCP-4KO* (7 jours post-infarctus);

*Récepteur ET_B : C) souris *WT* (1, 3 et 7 jours post-infarctus), D) souris *mMCP-4KO* (7 jours post-infarctus). *** $p < 0.001$.

DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons confirmé en premier lieu qu'à la suite de l'infarctus du myocarde irréversible chez la souris, la répression de la *mMCP-4* améliore la survie des souris tel que rapporté récemment (Houde *et al.*, 2018).

Au niveau du cœur, moins de mastocytes envahissent le muscle cardiaque et les mécanismes réparateurs sont associés à une meilleure survie des cardiomyocytes (moins d'apoptose) avec un dépôt de collagène plus important que dans les cœurs de souris de type *mMCP-4KO*, conférant ainsi une protection de la paroi ventriculaire protégée contre le risque de rupture.

De plus nos résultats suggèrent que la répression de la *mMCP-4* réduit l'expression pulmonaire des récepteurs à l'ET-1, récepteurs responsables de la constriction vasculaire pulmonaire et de la clairance du puissant peptide vasoactif dans les phases aigües de l'IDM.

I. VALIDATION OU INVALIDATION DE L'HYPOTHÈSE PRINCIPALE

Nous avons émis l'hypothèse que la *mMCP-4* module l'apparition de marqueurs cardiaques et systémiques associés à l'infarctus permanent du myocarde dans le modèle de souris. Parmi les phénomènes intéressants observés durant cette étude, nous avons tout d'abord noté que le nombre de mastocytes envahissant le muscle cardiaque en post-infarctus était différent dans les cœurs infarcis de souris *WT* versus *mMCP-4 KO*. Deuxièmement, la quantité de collagène déposée principalement au niveau de la zone infarcie est diminuée en présence de *mMCP-4*. Troisièmement, l'aire cardiaque apoptotique est plus importante en présence de *mMCP-4*. De plus, la présence de *mMCP-4* augmente le niveau d'ET-1 pulmonaire de façon concomitante à une dégranulation massive des mastocytes péritonéaux à un stade suraigu de l'infarctus du myocarde en plus de l'augmentation des niveaux d'expression des récepteurs à l'ET-1 au niveau des poumons. Seul le BNP, un important marqueur pronostic n'a pas été influencé par la présence ou l'absence de la *mMCP-4*.

L'hypothèse émise se confirme étant donné que l'ensemble des différences observées dans les conséquences de l'IDM au cours de cette étude sont en faveur du rôle néfaste de la *mMCP-4*.

II. AMÉLIORATION DE LA SURVIE DES SOURIS INFARCIES RÉPRIMÉES EN *MMCP-4*

L'analyse de survie Kaplan-Meier des souris infarcies *WT* versus *mMCP-4KO*, reproduite sur 7 jours, a donné un résultat comparable avec ce qui a été publié dans une étude récente réalisée au sein de notre laboratoire, mais qui portait toutefois sur une plus longue période de suivi de 21 jours (Houde *et al.*, 2018). La cause de mortalité principale rapportée dans cette étude a été la rupture cardiaque dans la souche de souris *WT* à partir du 4^{ème} jour post-infarctus, coïncidant avec la phase réparatrice et proliférative. L'augmentation de la survie serait en rapport avec une meilleure fonction cardiaque et un risque moindre de rupture cardiaque pouvant traduire des mécanismes réparateurs plus efficaces dans les souris *KO* par rapport aux *WT*. L'étude de la cause de mortalité post-infarctus a révélé dans notre 2^{ème} étude que 15% des souris *KO* versus 47% des souris *WT* sont décédées à cause d'une rupture cardiaque. Un taux de mortalité similaire causée par une rupture cardiaque en post-IDM a été observé dans les *C57Bl6*, où leur survie a été réduite par rapport à d'autres souches de souris telles que les souches *FVB*, *Swiss*, *BalbC* et *C57Bl6* génétiquement-modifiée comme la *mMP-2KO*. Ce risque de rupture est en rapport avec les propriétés génétiques de chaque souche de souris (Matsumura *et al.*, 2005; van den Borne *et al.*, 2009). La rupture de la paroi libre du ventricule gauche siège au niveau de la zone infarctée. En effet, dans la littérature, ce sont la bordure de l'infarctus en plus de la zone infarctée qui sont affectées par cet accident (Gao *et al.*, 2005)

Plusieurs études se sont intéressées à l'analyse de la survie dans des modèles animaux d'infarctus du myocarde irréversible à la suite de l'inhibition pharmacologique de la chymase et de sa répression génétique. Le point de départ de ces études a été la découverte de la suractivation de la chymase cardiaque à la suite d'un IDM et son rôle dans la modulation de la fonction cardiaque post-infarctus et son impact sur la survie (Jin *et al.*, 2002).

D'autres études ont aussi suggéré et confirmé le rôle bénéfique de l'inhibition pharmacologique de la chymase préventive et curative dans l'infarctus du myocarde irréversible chez le hamster. En effet, ce traitement a amélioré significativement la survie dans ce modèle expérimental, expliquée par l'amélioration de la fonction cardiaque par rapport aux animaux contrôles. Les principales causes de mortalité observées dans ce modèle

incluaient des arythmies et une insuffisance cardiaque, mais pas de rupture cardiaque rapportée dans ce modèle animal (Hoshino *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2003, 2002). Nos résultats sont donc en accord avec la littérature de notre laboratoire ainsi que d'autres institutions. Nous suggérons qu'une valeur ajoutée a toutefois été apportée avec nos expériences sur l'apport de la répression génétique de la chymase mastocytaire murine de type 4 sur la survie des souris en post-infarctus myocardique permanent en comparaison avec la souche *WT*.

III. MOINS D'APOPTOSE MYOCARDIQUE ASSOCIÉE À LA RÉPRESSION DE LA *mMCP-4*

Les résultats obtenus dans notre étude ont aussi montré un rôle de la chymase dans l'augmentation de l'apoptose au niveau de la zone infarctée du muscle cardiaque des souris *WT* au 3^{ème} jour post-infarctus tandis que dans les cœurs de souris *KO*, le phénomène d'apoptose est beaucoup moindre.

En effet, il est connu que la chymase est inductrice d'apoptose *in vitro* en inactivant la signalisation de survie médiée par la kinase d'adhésion focale (FAK), en plus du TNF- α qui déclenche l'apoptose *in vitro* (Heikkila *et al.*, 2007). De plus, la chymase dégrade l'IGF-1 qui a un rôle dans la signalisation promotrice de la survie cellulaire *in vivo*. Le dosage cardiaque de l'IGF-1 à 3 jours post-ischémie/reperfusion a mis en évidence qu'il était 1.7 fois plus élevé au niveau des cœurs de souris *mMCP-4KO* comparé à ceux des *WT*. À 3 jours post-ischémie/reperfusion, le niveau d'expression de la *mMCP-4* et de sa protéine s'élevait significativement au niveau des cœurs des souris *WT* par rapport aux tissus cardiaques sains. Ces observations expliqueraient l'augmentation de l'apoptose (étude TUNEL) au niveau des cœurs des souris *WT* comparés aux cœurs de souris *KO* (Tejada *et al.*, 2016). Ces observations démontrent de plus qu'il y a moins de signaux pro-apoptotiques en cas de répression de la chymase à la suite d'un IDM.

Dans notre étude, le 3^{ème} jour post-IDM permanent, inclus dans la phase inflammatoire aiguë, est caractérisé par un pic d'activité de la caspase-3 en rapport avec le mécanisme apoptotique cellulaire en cours au niveau de la zone infarctée. À un stade plus tardif (7 jours) dans les cœurs *WT*, le phénomène d'apoptose est réduit par rapport au 3^{ème} jour post-IDM. La diminution de l'apoptose traduit la diminution de l'activation de la caspase-3 en rapport avec la résolution de la réaction inflammatoire. Il a été démontré que l'activité de la chymase

au niveau du ventricule gauche chez les hamsters après IDM permanent demeure élevée à 7 jours. Cette élévation est soutenue dans le temps (Jin *et al.*, 2001). Le faible taux d'apoptose observé à 7 jours est compatible avec d'autres études où ce mécanisme s'estompe avec le temps (Qian *et al.*, 2011).

L'apoptose et la nécrose sont 2 mécanismes de mort cellulaire présents au cours de l'IDM. La nécrose est un phénomène passif secondaire à l'ischémie, alors que l'apoptose est un phénomène bien régulé et énergie dépendant. En fait, l'apoptose n'est pas limitée à la zone infarctée. Elle est présente aussi au niveau de la zone péri-infarctée et même dans le tissu à distance de la zone ischémique. Elle serait un déterminant majeur de la taille de l'infarctus (Krijnen *et al.*, 2002). La compréhension de son mécanisme et de ses bases moléculaires en rapport avec la répression de la chymase serait d'un grand apport en termes de sauvetage du tissu myocardique en post-IDM.

IV. LA RÉPRESSION DE LA CHYMASE AIDE À UN REMODELAGE CARDIAQUE FAVORABLE

1. L'INVASION MASTOCYTAIRE

L'augmentation de la densité en mastocytes au niveau du tissu cardiaque humain pathologique a été rapportée dans plusieurs études. De même, dans des modèles animaux d'IDM, il a été prouvé qu'il y a une accumulation de mastocytes au niveau de la région infarctée (Bot *et al.*, 2008) et de la région péri-infarctée (Tejada *et al.*, 2016). Cette augmentation du nombre de mastocytes serait due à des facteurs chimiotactiques tel que le Facteur de Cellule Souche (FCS). Il a été démontré que les macrophages du myocarde infarcté expriment ce facteur et participent donc au recrutement de mastocytes (Bot *et al.*, 2008). Par conséquent, à travers la libération de la chymase, il existe plus d'effets sur l'activation des MMP et sur la dégradation de la matrice extra-cellulaire, plus de TGF- β , plus de conversion d'angiotensine I en angiotensine II (Kritikou *et al.*, 2016) et d'ET-1.

La dégranulation mastocytaire précoce (TNF- α , Histamine) module la réponse inflammatoire à la phase aiguë post-IDM. À des stades plus tardifs, le mastocyte joue un rôle dans l'orchestration de l'interaction inter-cellulaire, des cytokines, des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extra-cellulaire impliquées dans la réparation cardiaque.

Les études qui se sont intéressées à l'évaluation de la densité mastocytaire en post-IDM, ont pu démontrer que le nombre de mastocytes augmente de façon importante à 72h post-I/R, à la phase inflammatoire aiguë. Cinq à sept jours plus tard, à la phase réparatrice, ce nombre au niveau de la zone fibreuse est beaucoup plus important par rapport aux zones distantes. Les facteurs responsables de l'accumulation des mastocytes ne sont pas tous identifiés. Le FCS est un agent chimiotactique mastocytaire puissant. Chez l'homme, il a été démontré que le FCS et les anaphylatoxines C3a et C5a sont les seuls facteurs qui induisent la migration mastocytaire. Particulièrement, le FCS contrôle la maturation et la survie des mastocytes (Frangogiannis, 2002). De façon réciproque, la chymase active le FCS (Janicki *et al.*, 2015). En effet, le FCS est produit par la cellule stromale sous forme liée à la membrane, libéré sous action protéolytique pour produire une forme bioactive soluble. La chymase humaine a été reconnue comme enzyme capable d'activer le FCS au niveau d'un site préférentiel. D'autres sources de FCS existent telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et même les mastocytes. De plus, il a été démontré que la dégranulation mastocytaire augmente le niveau tissulaire de FCS. Le FCS à son tour entraîne la dégranulation mastocytaire via son récepteur Kit (Longley *et al.*, 1997).

Dans notre étude, il y a une augmentation dans la quantification de la coloration de bleu de Toluidine au niveau de la coupe complète du tissu cardiaque, à 1 et 3 jours post-IDM non-confirmée au décompte des mastocytes, effectué seulement au niveau de la zone péri-infarctie. En effet, la coloration n'est pas strictement spécifique des mastocytes, puisque toute cellule nucléée en plus des mastocytes prend du bleu. Cette quantification reflèterait l'afflux des cellules inflammatoires au site de l'insulte cardiaque.

L'augmentation du nombre de mastocytes cardiaques au niveau de la zone péri-infarctie en conséquence à l'IDM est évident à 7 jours post-infarctus mais significativement plus élevé dans les *WT* que dans les *KO*. À 1 et 3 jours post-IDM, les *WT* semblent avoir plus de mastocytes en zone péri infarctus sans atteindre la significativité par rapport aux *KO*. Nos résultats dans la souris infarctie avec ligature permanente confirment ceux obtenus dans le modèle d'I/R où la densité mastocytaire au niveau de la région péri-infarctie a été évaluée à 3 jours post-IDM. Le groupe de Tejada et collaborateur a en effet montré qu'il y a une tendance, bien que non significative sans doute à cause du nombre restreint de cœurs analysés

(4 par groupe), vers l'augmentation de la densité mastocytaire au niveau des cœurs infarctés des souris *WT* par rapport aux *KO* (Tejada *et al.*, 2016).

La *mMCP-4* aurait donc un impact sur le mécanisme de maturation des cellules résidentes et de recrutement des cellules précurseurs des mastocytes en conséquence à l'IDM. Étant donné que la *mMCP-4* est pro-inflammatoire (Tejada *et al.*, 2016), il y aurait moins de signaux responsables du recrutement de cellules précurseurs et de la maturation de mastocytes au niveau du muscle cardiaque chez la souris *mMCP-4KO* par rapport aux *WT*.

2. FIBROSE MYOCARDIQUE

Les mastocytes constituent une source importante de cytokines, de facteurs de croissance supportant la prolifération fibroblastique et la formation de néovaisseaux. Les mastocytes jouent 2 rôles opposés dans la réparation tissulaire. D'une part, ils stimulent la synthèse de collagène menant à la formation de fibrose. D'autre part, ils induisent l'activation des métalloprotéinases de la matrice qui dégradent le collagène (Janicki *et al.*, 2015). Il reste encore à mieux comprendre la balance derrière la synthèse et la dégradation du collagène.

Les mastocytes jouent par ailleurs un rôle central dans le phénomène de remodelage cardiaque en conséquence d'une lésion. La densité en mastocytes est corrélée à la concentration de collagène déposé au sein du myocarde (Janicki *et al.*, 2015).

La chymase est responsable de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. En effet, les pro-métalloprotéinases comme les pro-collagénases constituent des substrats pour la chymase. De plus, la chymase dégrade l'inhibiteur de la métalloprotéinase tissulaire-1. L'activation des métalloprotéinases cause une dégradation tissulaire inadéquate causant la migration des fibroblastes et la fibrose tissulaire. Par ailleurs, la formation de fibrose tissulaire est assistée par l'activation du TGF- β . La chymase cause la fibrose tissulaire secondairement à la dégradation tissulaire (Sukenaga *et al.*, 2002).

Étant donné que le tissu cardiaque adulte a une capacité de régénération réduite (Prabhu and Frangogiannis, 2016), la phase réparatrice à la suite de l'IDM est caractérisée par la suppression des cellules mortes et des débris de matrice remplacés ultérieurement par une cicatrice faite principalement de collagène. Le phénomène de cicatrisation est associé à des changements à l'échelle moléculaire et cellulaire au niveau des zones infarctées et

distantes ce qui cause des modifications ventriculaires géométriques, un phénomène nommé remodelage cardiaque (Chen and Frangogiannis, 2013). À l'échelle anatomique, le remodelage cardiaque a été bien évident en comparant les cœurs des souris infarcies versus les sham à 7 jours post-IDM dans les 2 souches de souris. En effet, une augmentation du poids des cœurs en rapport avec son hypertrophie a été mise en évidence. Ce remodelage est un phénomène compensatoire adaptatif secondaire au stress mécanique et physiologique dû à l'infarctus du myocarde (Schirone et al., 2017).

En plus de l'action de la chymase via l'activation des métalloprotéinases et la dégradation de l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-1, le TGF- β constitue un stimulus majeur de la fibrose myocardique en induisant l'expression du collagène de type I et III. Le TGF- β est une cytokine synthétisée de façon ubiquitaire en plus des mastocytes. Il est activé par la chymase. Le niveau d'expression de TGF- β est augmenté même au niveau de la région non-infarctée du myocarde. Le niveau de fibrose observé en post-IDM chez le rat à 4 semaines post-chirurgie, a été élevée de façon significative dans le groupe véhicule comparé au groupe traité par NK3201, un inhibiteur de la chymase (Kanemitsu *et al.*, 2006).

Les modèles d'IDM dans lesquels les chercheurs ont testé un inhibiteur de chymase ont démontré que la constitution de fibrose au niveau du tissu cardiaque est moindre comparativement aux cœurs d'animaux contrôles (Oyamada *et al.*, 2011). Le modèle de souris réprimée pour la *mMCP-4* n'avait pas été évalué au niveau des mêmes mécanismes de fibrose. Notre étude suggère que dans les souris infarcies de souche *mMCP-4 KO*, la fibrose joue un rôle protecteur puisque plus de collagène de type I et III se retrouvent au niveau de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. En revanche, Kanemitsu a déduit la réduction de la fibrose après traitement à l'inhibiteur de la chymase NK3201. La détermination de la fibrose dans cette dernière étude a été basée sur le ratio : aire fibrosée / aire totale du ventricule gauche. Or, l'aire fibrosée est proportionnelle à la taille de l'infarctus qui est plus réduite au niveau des *mMCP-4KO* (Houde et al., 2018; Kanemitsu et al., 2006). Nous suggérons que la chymase au niveau des cœurs de souris *WT* redirige le remodelage cardiaque vers la dégradation matricielle par rapport à la synthèse de collagène ceci prédisposant les souris de type sauvage à avoir des zones infarcies amincies, vulnérables et sujettes à la rupture.

Il est toutefois connu que la fibrose cause une rigidité à la paroi ventriculaire et une moindre compliance nécessaire pour le remplissage cardiaque diastolique et hypokinésie à l'éjection systolique prédisposant à l'insuffisance cardiaque. Une évaluation de la fonction cardiaque à un stade plus ou moins tardif chez la souris *mMCP-4KO* pourrait mieux détecter une telle complication et stratifier son niveau de gravité.

V. LE BNP : FACTEUR PRONOSTIC *mMCP-4* INDÉPENDANT

Chez l'Homme, le BNP plasmatique augmente à la suite de l'infarctus du myocarde (Morita *et al.*, 1993). À notre connaissance, le dosage de BNP dans le plasma de souris *mMCP-4KO* à la suite de l'infarctus du myocarde réversible ou permanent chez la souris n'avait pas encore été rapporté. La comparaison du dosage de BNP au niveau du plasma des souris infarctées et shams *WT* et *mMCP-4KO* n'a pas montré de différence distinctive entre les 2 souches aux différents temps post-IDM préalablement indiqué dans ce mémoire. Il est intéressant aussi de noter que la ligature coronarienne et la chirurgie sham induisent l'augmentation de la concentration de BNP, au cours de la phase aigüe post-opératoire, parallèlement dans les 2 souches puis sa diminution vers le 7^{ème} jour. D'autres marqueurs cardiaques comme les troponines I ont été étudiés dans l'I/R dans les *KO* et a démontré un niveau plus bas par rapport aux *WT*.

De point de vue pronostique, le BNP ne constitue donc pas, dans notre modèle, un facteur déterminant en rapport avec l'effet de la chymase au cours de la phase aigüe de l>IDM et devant son augmentation dans les shams, cette hormone peut augmenter face à une insulte cardiaque de façon non-spécifique.

VI. PARTICIPATION DE LA CHYMASE DANS LA SYNTHÈSE D'ET-1

Nous avons observé antérieurement que le niveau pulmonaire d'ET-1 est significativement plus élevé à l'état basal au niveau du poumon sain (organe de clairance de l'ET-1) (Houde *et al.*, 2013) et dans les poumons de souris *WT* infarctées par rapport aux souris *KO* à 24h post-IDM (Houde *et al.*, 2018). Dans cette étude, nous démontrons que les mastocytes au niveau de la cavité péritonéale ont été dégranulés à 24h post-IDM, à travers les essais enzymatiques avec un substrat spécifique aux enzymes de type chymotrypsine chez les souris *WT*. D'après ces essais dans les souris *KO*, la *mMCP-4* constitue la principale

enzyme responsable du clivage du peptide fluorogénique et de l'émission de fluorescence. Cette corrélation dégranulation versus niveau élevé d'ET-1 plasmatique (Cernacek *et al.*, 2003; Katayama *et al.*, 2005; Miyauchi *et al.*, 1989; Setsuta *et al.*, 1995) et pulmonaire (Houde *et al.*, 2018) en stade aigu d'IDM suggère qu'il y a une participation des mastocytes distants dans la synthèse d'ET-1 en phase aigüe post-IDM. Nous suggérons que ce mécanisme aggrave le pronostic chez les souris *WT* étant donné que l'élévation des taux plasmatique d'ET-1 est corrélé au pronostic.

Par ailleurs, l'activité enzymatique de la chymase au niveau du muscle cardiaque aurait pu être évaluée, surtout que notre laboratoire a déjà démontré une activité hydrolytique *mMCP-4*-dépendante dans des cœurs de souris non-infarctées (Houde *et al.*, 2013)). Cette expérience aurait pu être pertinente pour comparer l'activité chymasique endogène dans les 2 souches de souris aux différents temps post-infarctus. Une caractérisation des mastocytes cardiaques (migration de cellules matures ou cellule progénitrices en voie de maturation, dégranulation et renouvellement du stock de chymase) aurait pu être utile.

Chez l'homme, au cours de l'IDM, le système endothélial est fortement sollicité. En effet, les niveaux d'ET-1 plasmatiques sont élevés au bout de quelques heures de l'installation de l'IDM. En absence de complication sa concentration atteint un pic après 6h et puis revient à un niveau basal. En présence de complication, la concentration d'ET-1 demeure élevée pour au moins 72h. Le niveau d'ET-1 à 3 jours post-IDM est considéré comme un facteur pronostique corrélé à la survie à long terme. L'origine de cette augmentation est controversée et encore mal élucidée. Le système endothélial cardiaque est activé au cours de l'IDM et participe à la synthèse d'ET-1 puisque le cœur ischémique libère de l'ET-1 *in vitro*. De plus, dans un modèle d'I/R chez le rat, l'ET-1 plasmatique augmente après 50 minutes de l'occlusion et s'accroît après reperfusion. D'où, un phénomène de *wash out* est suggéré pour expliquer la participation cardiaque de la synthèse de l'ET-1 (Cernacek *et al.*, 2003).

Une autre étude chez l'homme suggère que la concentration plasmatique d'ET-1 élevée provient du lit vasculaire pulmonaire dû à une insuffisance ventriculaire gauche aiguë au stade précoce de l'IDM, tandis qu'à un stade plus tardif, l'augmentation de l'ET-1 serait en rapport avec la taille de l'infarctus (Setsuta *et al.*, 1995).

Le rôle de l'ET-1 au cours des phases aiguës et tardives de l'IDM est relié à son effet inflammatoire intense, pro-mitogène et pro-fibrotique, des phénomènes importants pour la guérison de la région infarctée. D'un côté, l'ET-1 joue un rôle dans la stabilisation de la région nécrosée et la cicatrisation, étant donné que la quantité d'ET-1 est plusieurs fois plus importante dans la région infarctée comparée au restant du cœur. D'un autre côté, l'ET-1 cause une vasoconstriction des coronaires en plus de son effet chronotrope positif occasionnant une aggravation de l'ischémie cardiaque et une diminution de la fraction d'éjection (Cernacek *et al.*, 2003). Finalement, l'élévation du niveau d'ET-1 plasmatique constitue un facteur de mauvais pronostic corrélé au dysfonctionnement ventriculaire gauche et des complications majeures incluant le décès (Katayama *et al.*, 2005).

Le niveau basal d'ET-1 plasmatique ne varie pas entre les souris *WT* et *KO*. Par voie systémique, la *Big ET-1* injectée induit, chez les souris *WT*, une augmentation de la pression artérielle moyenne. Cette augmentation est réduite de 50% chez la souris *KO* (Cernacek *et al.*, 2003; Dupuis *et al.*, 1998; Kawanabe and Nauli, 2011).

Par ailleurs, 40% des cellules endothéliales vasculaires se trouve dans le système pulmonaire constituant ainsi la principale source d'ET-1 (Eigler, 1990). Étant donné que les mastocytes pulmonaires sont majoritairement des mastocytes des tissus muqueux, et que les mastocytes du tissu conjonctif (chymase+) deviennent de plus en plus rares en allant de la trachée vers les alvéoles (Welle, 1997), nous supposons que la principale source de synthèse alternative d'ET-1 serait les mastocytes chymase positifs dont les mastocytes péritonéaux.

L'augmentation d'ET-1 en phase aiguë post-IDM dans les souris *WT* comparées aux *KO* est due à la voie alternative de synthèse chymase dépendante. Cette voie implique la *mMCP-4* qui est en rapport direct avec les cellules endothéliales de l'axe cardio-pulmonaire et systémique (péritonéale dans ce cas).

L'IDM cause une réaction inflammatoire généralisée (Fang *et al.*, 2015). Le système endothélial est activé de façon importante. Le mastocyte à distance constitue une cellule cible de plusieurs stimuli, amenant à sa dégranulation et à la libération de la chymase impliquée dans la synthèse d'ET-1.

VII. LA *mMCP-4* MODULE LES NIVEAUX D'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS DE L'ENDOTHÉLINE-1 AU NIVEAU PULMONAIRE

Le système endothélial est activé au cours de l'IDM. Une étude du niveau d'expression des récepteurs à l'ET-1 a été réalisée pour voir si les récepteurs sont aussi touchés. En effet, d'après nos résultats, l'augmentation des niveaux d'ET-1 n'est pas secondaire à une régulation à la baisse de l'expression des récepteurs de clairance dans la phase aiguë post-IDM (1 et 3 jours). En revanche, à 7 jours, il y a une augmentation des niveaux d'expression des récepteurs ET_A et ET_B dans les poumons de souris *WT* contrairement aux poumons de souris *mMCP-4KO*.

Certaines études ont montré une diminution de la clairance pulmonaire d'ET-1 par diminution de l'expression du récepteur ET_B associée à des niveaux élevés d'ET-1 à un stade plus tardif post-IDM, après développement d'une insuffisance cardiaque chronique (Cernacek *et al.*, 2003; Dupuis *et al.*, 1998; Kawanabe and Nauli, 2011).

Une surexpression des récepteurs pulmonaires à l'ET-1 se voit au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire. Cette augmentation est associée à des taux d'ET-1 circulants et pulmonaires élevés (Kawanabe and Nauli, 2011).

Il existerait donc un mécanisme de retro-contrôle de la synthèse d'ET-1 impliquant la chymase, associé ou non à d'autres mécanismes multifactoriels, et le niveau d'expression des récepteurs ET_A et ET_B puisque, dans les souris *mMCP-4KO*, il n'y a pas de variation de l'expression de ces récepteurs. Une étude antérieure de ces récepteurs à un stade précoce de l'IDM n'a jamais été réalisée. Cette évaluation a été réalisée principalement à des stades de complications de la pathologie cardiaque post-ischémique telle que l'insuffisance cardiaque (Cernacek *et al.*, 2003; Dupuis *et al.*, 1998) et l'hypertension artérielle pulmonaire (Dupuis *et al.*, 1998).

En effet, des études ont réussi à mettre en évidence que l'augmentation d'ET-1 est associée à des changements des caractéristiques des récepteurs à l'ET-1 de point de vue expression génique, densité et même affinité (Cernacek *et al.*, 2003). Ce phénomène devrait être en rapport avec la présence tissulaire de chymase. Ainsi, il y aurait une régulation chymase dépendante directe et/ou indirecte du niveau d'expression des récepteurs à l'ET-1.

Il y aurait probablement, une induction de l'expression de certains gènes tels que celui de l'ET_A dépendant de la chymase à travers l'activation des facteurs de transcription.

Par ailleurs, plusieurs évidences suggèrent une induction de l'expression de l'ET-1 et de ses récepteurs dans plusieurs pathologies entraînant ainsi une régulation de la perfusion vasculaire et de la clairance d'excès d'ET-1, sous la forme d'une boucle de régulation autocrine/paracrine. Via le récepteur ET_A, l'ET-1 promeut la survie et l'hypertrophie des cardiomyocytes et la mitogénèse tandis que via le récepteur ET_B, le niveau extra-cellulaire d'ET-1 élevé est contrôlé (Del Bufalo *et al.*, 2002; Shohet *et al.*, 2004; Torbidoni *et al.*, 2005).

Dans notre étude, le niveau d'ET-1 à 7 jours post-IDM n'a pas été évalué. De plus, nous ne savons pas si au niveau protéique les récepteurs à l'ET-1 sont surexprimés du même ordre de grandeur et si leurs affinités sont affectées puisque des antagonistes mixtes aux récepteurs ET_A et ET_B en post-IDM sont hyperréactifs par rapport au contrôle dans un modèle porcin (Houweling *et al.*, 2006).

Étant donné que le cœur et les poumons constituent une unité anatomique et fonctionnelle inséparable, il existe des répercussions mutuelles dans des conditions pathologiques. Dans le cadre de l'infarctus du myocarde, il se développe une insuffisance cardiaque congestive avec une congestion pulmonaire passive et une hypoxémie conséquente. Il existe alors un parallélisme entre la saturation veineuse centrale, l'insuffisance cardiaque et dysfonctionnement pulmonaire (Cano and Meaney, 1975)

L'hypertension pulmonaire et le remodelage structural pulmonaire sont parmi les conséquences de cette insuffisance cardiaque congestive. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces différentes complications restent encore mal connus (Jasmin, 2004).

Avec la poursuite des études mécanistiques sous-jacentes à ces conditions pathologiques, une thérapie bien ciblée pourrait apporter des avantages dans les conduites thérapeutiques des complications post-IDM chez l'homme, si nos résultats dans le modèle murin peuvent être transposés chez le patient.

VIII. RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS RAPPORTÉS DANS L'ÉTUDE

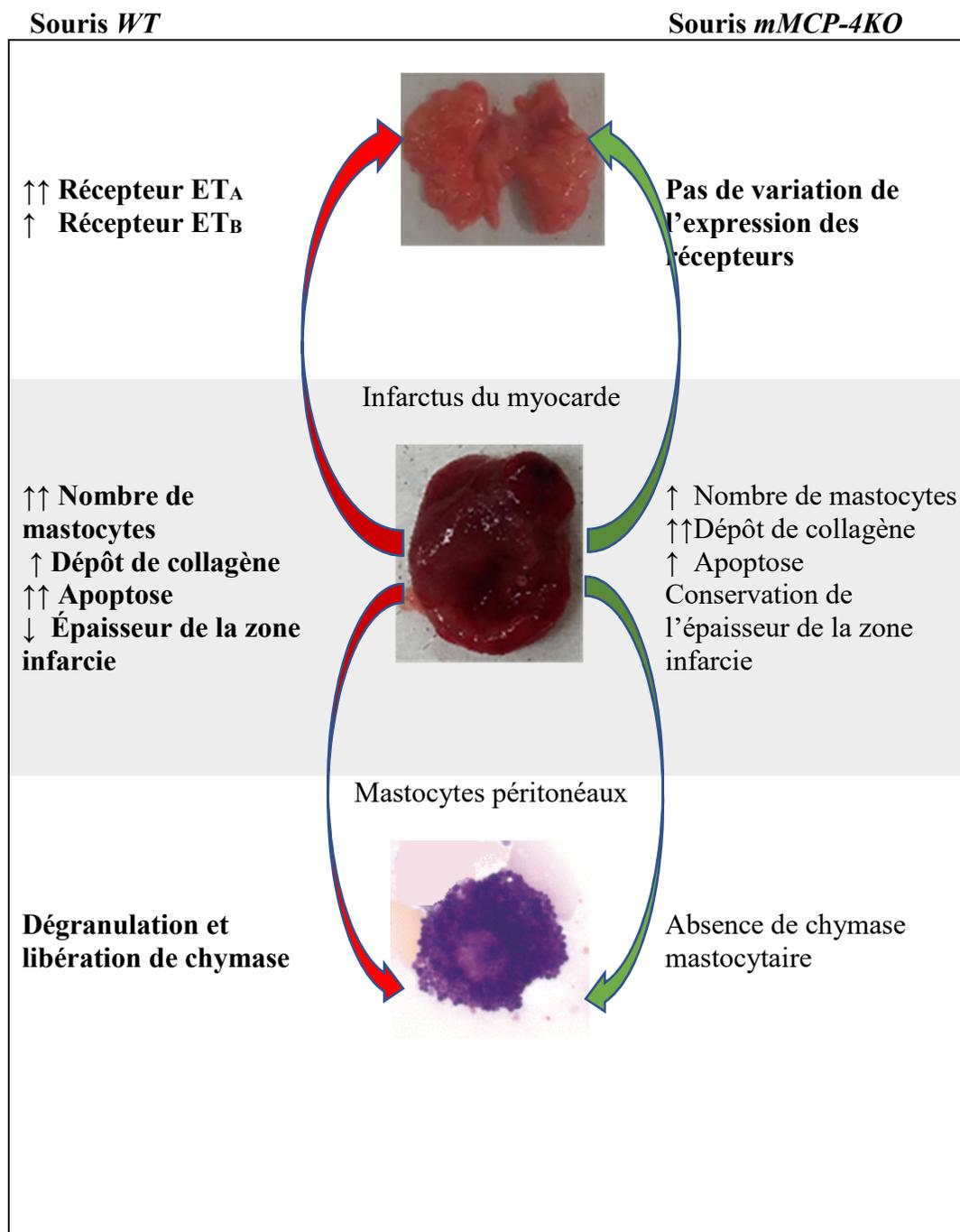


Figure 26 : Schéma récapitulatif des conséquences d'un infarctus du myocarde chez la souris *WT* vs *mMCP-4KO*, à l'échelle locale et à distance du cœur, observées au cours de notre étude (Photo poumons et cœur infarcté de souris, mastocyte adapté de (Molderings *et al.*, 2016))

IX. LIMITES DE L'ÉTUDE

D'abord, le nombre de souris utilisé dans la courbe de survie est réduit (une vingtaine). Ensuite, l'étude des mastocytes cardiaques aurait pu être plus précise grâce à un immunomarquage spécifique de la tryptase ou au mieux une quantification des mastocytes chymase-positifs vs mastocytes totaux. Nous n'avons pas de plus caractérisé la dégranulation des mastocytes péritonéaux dans les souris *mMCP-4KO* en utilisant un substrat spécifique à une autre enzyme mastocytaire pour prouver leur caractéristique chymase-dépendante en post-IDM. Finalement, il aurait été intéressant de doser l'ET-1 pulmonaire à 7 jours post-IDM en corrélation avec les niveaux d'expression des récepteurs de ce peptide.

X. PERSPECTIVES

1. ÉTUDE CELLULAIRE CARDIAQUE POST-IDM

Il serait intéressant de caractériser l'évolution du processus du remodelage cardiaque à l'échelle cellulaire : les cellules inflammatoires envahissant le cœur, les mastocytes particulièrement (cellules précurseurs, maturation), la disparition progressive des cardiomyocytes au niveau de la zone infarctée, l'activation des fibroblastes et leur différenciation.

De plus, il serait important d'évaluer la contribution des 2 phénomènes de mort cellulaire (apoptose et nécrose) au niveau du muscle cardiaque post-IDM.

2. ÉTUDE DES MASTOCYTES PULMONAIRES

Étant donné que les poumons sont considérés comme un organe principal dans la production d'ET-1 et que cette production est plus accentuée dans les suites d'un IDM, une caractérisation des mastocytes pulmonaires de point de vue nombre, présence de chymase (la population prédominante en état physiologique de type tissu conjonctif, n'exprimant pas la chymase).

3. ÉTUDE DES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX

L'inhibition de la dégranulation des mastocytes péritonéaux ou leur déplétion en chymase antérieurement à l'induction de l'IDM permettrait d'évaluer leur participation dans la synthèse d'ET-1 systémique.

4. ÉTUDE HÉMODYNAMIQUE

Une évaluation de la fonction cardiaque et de la résistance vasculaire pulmonaire des souris *mMCP-4KO* à long terme serait importante pour voir l'impact de la fibrose (rigidité++) sur le développement d'une éventuelle insuffisance cardiaque chronique et d'une hypertension artérielle pulmonaire.

5. ÉTUDE DU REMODELAGE PULMONAIRE

Les poumons sont en étroite relation avec le cœur. Devant le développement possible d'une hypertension artérielle pulmonaire et d'un remodelage, il serait important de comparer le développement d'une fibrose pulmonaire à un stade précoce et tardif post-IDM dans les 2 souches.

6. EFFETS DE LA CHYMASE SEXE-DÉPENDANT?

Étant donné que les œstrogènes sont des stabilisateurs mastocytaires (Levick *et al.*, 2011), l'étude de la réactivité mastocytaire cardiaque et extra-cardiaque secondaire à l'infarctus du myocarde chez des souris femelles permettra d'évaluer l'effet bénéfique d'un stabilisateur mastocytaire physiologique et de déceler des différences physiopathologiques entre la souche *WT* et *mMCP-4KO*. Est-ce que cette stabilisation physiologique des mastocytes, serait un des facteurs protecteurs contre les atteintes cardiovasculaires chez la femme en pré-ménopause?

7. VERS UNE AVANCÉE THÉRAPEUTIQUE CHEZ L'HOMME

Cette étude a permis de mieux comprendre certains aspects relatifs aux conséquences de l'infarctus du myocarde. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à cette pathologie permettra une meilleure prise en charge thérapeutique. Étant donné que le rôle délétère de la chymase est bien établi. Un jour, une thérapie à base d'inhibiteur de la chymase pourra prendre place avec les traitements habituels de l'infarctus du myocarde.

XI. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Cette étude nous a permis d'identifier quelques marqueurs conférant une cardioprotection associée à la répression de la chymase murine de type 4 chez des souris

après l'induction d'un infarctus du myocarde permanent. La répression de la chymase améliore la survie des souris grâce à un remodelage tissulaire myocardique plus favorable protégeant mieux contre la rupture cardiaque, une apoptose moindre, en plus, de l'absence de variation de l'expression des récepteurs à l'ET-1 au niveau pulmonaire. L'étude du BNP plasmatique ne constitue pas un facteur pronostique relatif à la présence de chymase.

D'autres études mécanistiques, pourraient approfondir la connaissance sur le rôle du mastocyte dans le développement de l'IDM à travers la sérine protéase chymase qui, lorsqu'inhibée, pourrait améliorer le décours et les conséquences de cette pathologie chez l'homme.

RÉFÉRENCES

- Battle, M., Pérez-Villa, F., Lázaro, A., Garcia-Pras, E., Ramirez, J., Ortiz, J., Orús, J., Roqué, M., Heras, M., Roig, E., 2007. Correlation Between Mast Cell Density and Myocardial Fibrosis in Congestive Heart Failure Patients. *Transplantation Proceedings* 39, 2347–2349. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.06.047>
- Beghdadi, W., 2011. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Frontiers in Immunology* 2. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00037>
- Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Delling, F.N., Deo, R., de Ferranti, S.D., Ferguson, J.F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Lutsey, P.L., Mackey, J.S., Matchar, D.B., Matsushita, K., Mussolino, M.E., Nasir, K., O’Flaherty, M., Palaniappan, L.P., Pandey, A., Pandey, D.K., Reeves, M.J., Ritchey, M.D., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sampson, U.K.A., Satou, G.M., Shah, S.H., Spartano, N.L., Tirschwell, D.L., Tsao, C.W., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H.Y., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P., 2018. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137, e67–e492. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>
- Berk, B.C., Weintraub, W.S., Alexander, R.W., 1990. Elevation of C-reactive protein in “active” coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 65, 168–172.
- Bhattacharya, K., Farwell, K., Huang, M., Kempuraj, D., Donelan, J., Papaliadis, D., Vasiadi, M., Theoharides, T.C., 2007. Mast Cell Deficient W/W^v Mice Have Lower Serum IL-6 and Less Cardiac Tissue Necrosis Than Their Normal Littermates following Myocardial Ischemia-Reperfusion. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 20, 69–74. <https://doi.org/10.1177/039463200702000108>
- Boateng, S., Sanborn, T., 2013. Acute myocardial infarction. *Disease-a-Month* 59, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.12.004>
- Bot, I., van Berkel, T., Biessen, E., 2008. Mast Cells: Pivotal Players in Cardiovascular Diseases. *Current Cardiology Reviews* 4, 170–178. <https://doi.org/10.2174/157340308785160624>
- Camacho, P., Fan, H., Liu, Z., He, J.-Q., 2016. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis* 6, 70–80.
- Cano, A.E., Meaney, E., 1975. [Pulmonary complications of acute myocardial infarct. Therapeutic orientation]. *Arch Inst Cardiol Mex* 45, 344–356.
- Cernacek, P., Stewart, D.J., Monge, J.-C., Rouleau, J.-L., 2003. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81, 598–606. <https://doi.org/10.1139/y03-052>
- Chen, W., Frangogiannis, N.G., 2013. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 945–953. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.023>
- Davenport, A.P., Hyndman, K.A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D.E., Pollock, J.S., Pollock, D.M., Webb, D.J., Maguire, J.J., 2016. Endothelin. *Pharmacological Reviews* 68, 357–418. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>

- Del Bufalo, D., Di Castro, V., Biroccio, A., Salani, D., Rosanò, L., Spinella, F., Bagnato, A., 2002. Endothelin-1 acts as a survival factor in ovarian carcinoma cells. *Clinical Science* 103, 302S-305S. <https://doi.org/10.1042/CS103S302S>
- Doggrell, S., 2004. Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovascular Research* 61, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.029>
- Doggrell, S.A., 2004. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 8, 191–201. <https://doi.org/10.1517/14728222.8.3.191>
- Duan, W.R., Garner, D.S., Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S., Blomme, E.A., 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *The Journal of Pathology* 199, 221–228. <https://doi.org/10.1002/path.1289>
- Dupuis, J., Rouleau, J.L., Cernacek, P., 1998. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction. *Circulation* 98, 1684–1687.
- Eigler, N., 1990. *Hemodynamics*, William R. Milnor, Williams & Wilkins, Baltimore (1989), 417 pages, illustrated, \$74.95, ISBN: 0-683-06049-X. *Clinical Cardiology* 13, 821a–821a. <https://doi.org/10.1002/clc.4960131118>
- Emoto, N., Yanagisawa, M., 1995. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* 270, 15262–15268. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15262>
- Fang, L., Moore, X.-L., Dart, A.M., Wang, L.-M., 2015. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol* 12, 305–312. <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.020>
- Frangogiannis, N., 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 53, 31–47. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00434-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00434-5)
- Frangogiannis, N.G., Perrard, J.L., Mendoza, L.H., Burns, A.R., Lindsey, M.L., Ballantyne, C.M., Michael, L.H., Smith, C.W., Entman, M.L., 1998. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 98, 687–698.
- Gailit, J., Marchese, M.J., Kew, R.R., Gruber, B.L., 2001. The Differentiation and Function of Myofibroblasts is Regulated by Mast Cell Mediators. *Journal of Investigative Dermatology* 117, 1113–1119. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.15211.x>
- Galli, S.J., Tsai, M., Marichal, T., Tchougounova, E., Reber, L.L., Pejler, G., 2015. Approaches for Analyzing the Roles of Mast Cells and Their Proteases In Vivo, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 45–127. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2014.11.002>
- Gao, X., Xu, Q., Kiriazis, H., Dart, A., Du, X., 2005. Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. *Cardiovascular Research* 65, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.10.014>
- Guo, X., Yuan, S., Liu, Y., Zeng, Y., Xie, H., Liu, Z., Zhang, S., Fang, Q., Wang, J., Shen, Z., 2016. Serum IgE levels are associated with coronary artery disease severity.

- Atherosclerosis 251, 355–360.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.020>
- Hara, M., Matsumori, A., Ono, K., Kido, H., Hwang, M.W., Miyamoto, T., Iwasaki, A., Okada, M., Nakatani, K., Sasayama, S., 1999. Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vitro. *Circulation* 100, 1443–1449.
- Heikkila, H.M., Latti, S., Leskinen, M.J., Hakala, J.K., Kovanen, P.T., Lindstedt, K.A., 2007. Activated Mast Cells Induce Endothelial Cell Apoptosis by a Combined Action of Chymase and Tumor Necrosis Factor-. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 309–314. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151340>
- Heusch, G., Gersh, B.J., 2016. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *European Heart Journal* ehw224. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw224>
- Hoshino, F., Urata, H., Inoue, Y., Saito, Y., Yahiro, E., Ideishi, M., Arakawa, K., Saku, K., 2003. Chymase inhibitor improves survival in hamsters with myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41 Suppl 1, S11-18.
- Houde, M., Jamain, M.-D., Labonte, J., Desbiens, L., Pejler, G., Gurish, M., Takai, S., D’Orleans-Juste, P., 2013. Pivotal Role of Mouse Mast Cell Protease 4 in the Conversion and Pressor Properties of Big-Endothelin-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 346, 31–37. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.202275>
- Houde, M., Schwertani, A., Touil, H., Desbiens, L., Sarrhini, O., Lecomte, R., Lepage, M., Gagnon, H., Takai, S., Pejler, G., Jacques, D., Gobeil, F., Day, R., D’Orléans-Juste, P., 2018. Mouse Mast Cell Protease 4 Deletion Protects Heart Function and Survival After Permanent Myocardial Infarction. *Frontiers in Pharmacology* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00868>
- Houweling, B., Merkus, D., Sorop, O., Boomsma, F., Duncker, D.J., 2006. Role of endothelin receptor activation in secondary pulmonary hypertension in awake swine after myocardial infarction: Endothelin receptors and secondary pulmonary hypertension. *The Journal of Physiology* 574, 615–626. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.107060>
- Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M.J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A.L.P., Crea, F., Goudevenos, J.A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M.J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimský, P., ESC Scientific Document Group, Collet, J.-P., Kristensen, S.D., Aboyans, V., Baumbach, A., Bugiardini, R., Coman, I.M., Delgado, V., Fitzsimons, D., Gaemperli, O., Gershlick, A.H., Gielen, S., Harjola, V.-P., Katus, H.A., Knuuti, J., Kolh, P., Leclercq, C., Lip, G.Y.H., Morais, J., Neskovic, A.N., Neumann, F.-J., Niessner, A., Piepoli, M.F., Richter, D.J., Shlyakhto, E., Simpson, I.A., Steg, P.G., Terkelsen, C.J., Thygesen, K., Windecker, S., Zamorano, J.L., Zeymer, U., Windecker, S., Aboyans, V., Agewall, S., Barbato, E., Bueno, H., Coca, A., Collet, J.-P., Coman, I.M., Dean, V., Delgado, V., Fitzsimons, D., Gaemperli, O., Hindricks, G., Iung, B., Jüni, P., Katus, H.A., Knuuti, J., Lancellotti, P., Leclercq, C., McDonagh, T., Piepoli, M.F., Ponikowski, P., Richter, D.J., Roffi, M., Shlyakhto, E., Simpson, I.A., Zamorano, J.L., Chettibi, M., Hayrapetyan, H.G., Metzler, B., Ibrahimov, F., Sujayeva, V., Beauloye, C., Dizdarevic-Hudic, L.,

- Karamfiloff, K., Skoric, B., Antoniadis, L., Tousek, P., Terkelsen, P.J., Shaheen, S.M., Marandi, T., Niemelä, M., Kedev, S., Gilard, M., Aladashvili, A., Elsaesser, A., Kanakakis, I.G., Merkely, B., Gudnason, T., Iakobishvili, Z., Bolognese, L., Berkinbayev, S., Bajraktari, G., Beishenkulov, M., Zake, I., Lamin, H.B., Gustiene, O., Pereira, B., Xuereb, R.G., Ztot, S., Juliebø, V., Legutko, J., Timóteo, A.T., Tatu-Chițoiu, G., Yakovlev, A., Bertelli, L., Nedeljkovic, M., Studenčan, M., Bunc, M., García de Castro, A.M., Petursson, P., Jeger, R., Mourali, M.S., Yildirim, A., Parkhomenko, A., Gale, C.P., 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal* 39, 119–177. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>
- Istrătoaie, O., Ofițeru, A.-M., Nicola, G.-C., Radu, R.-I., Florescu, C., Mogoantă, L., Streba, C.T., 2015. Myocardial interstitial fibrosis - histological and immunohistochemical aspects. *Rom J Morphol Embryol* 56, 1473–1480.
- Janicki, J.S., Brower, G.L., Levick, S.P., 2015. The Emerging Prominence of the Cardiac Mast Cell as a Potent Mediator of Adverse Myocardial Remodeling, in: Hughes, M.R., McNagny, K.M. (Eds.), *Mast Cells*. Springer New York, New York, NY, pp. 121–139. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_8
- Jasmin, J., 2004. Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovascular Research* 63, 747–755. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.018>
- Jin, D., Takai, S., Yamada, M., Sakaguchi, M., Kamoshita, K., Ishida, K., Sukenaga, Y., Miyazaki, M., 2003. Impact of chymase inhibitor on cardiac function and survival after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 60, 413–420.
- Jin, D., Takai, S., Yamada, M., Sakaguchi, M., Miyazaki, M., 2002. Beneficial effects of cardiac chymase inhibition during the acute phase of myocardial infarction. *Life Sci.* 71, 437–446.
- Jin, D., Takai, S., Yamada, M., Sakaguchi, M., Yao, Y., Miyazaki, M., 2001. Possible roles of cardiac chymase after myocardial infarction in hamster hearts. *Jpn. J. Pharmacol.* 86, 203–214.
- Jugdutt, B.I., 2004. Apoptosis after reperfused myocardial infarction: Role of angiotensin II. *Exp Clin Cardiol* 9, 219–228.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W.A., Sonnenblick, E.H., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G., Anversa, P., 1996. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Invest.* 74, 86–107.
- Kanemitsu, H., Takai, S., Tsuneyoshi, H., Nishina, T., Yoshikawa, K., Miyazaki, M., Ikeda, T., Komeda, M., 2006. Chymase Inhibition Prevents Cardiac Fibrosis and Dysfunction after Myocardial Infarction in Rats. *Hypertension Research* 29, 57–64. <https://doi.org/10.1291/hypres.29.57>
- Katayama, T., Yano, K., Nakashima, H., Takagi, C., Honda, Y., Suzuki, S., Iwasaki, Y., 2005. Clinical significance of acute-phase endothelin-1 in acute myocardial infarction patients treated with direct coronary angioplasty. *Circ. J.* 69, 654–658.
- Kawanabe, Y., Nauli, S.M., 2011. Endothelin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 195–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0518-0>

- Krijnen, P. a. J., Nijmeijer, R., Meijer, C.J.L.M., Visser, C.A., Hack, C.E., Niessen, H.W.M., 2002. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J. Clin. Pathol.* 55, 801–811.
- Kritikou, E., Kuiper, J., Kovanen, P.T., Bot, I., 2016. The impact of mast cells on cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology* 778, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.050>
- Krystal-Whittemore, M., Dileepan, K.N., Wood, J.G., 2016. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in Immunology* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
- Kumar, D., Hacker, T.A., Buck, J., Whitesell, L.F., Kaji, E.H., Douglas, P.S., Kamp, T.J., 2005. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron. Artery Dis.* 16, 41–44.
- Kuruppu, S., Rajapakse, N.W., Smith, A.I., 2013. Endothelin-converting enzyme-1 inhibition and renoprotection in end-stage renal disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465, 929–934. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1216-1>
- Levick, S.P., Melendez, G.C., Plante, E., McLarty, J.L., Brower, G.L., Janicki, J.S., 2011. Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodelling. *Cardiovascular Research* 89, 12–19. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq272>
- Lindstedt, L., Lee, M., Kovanen, P.T., 2001. Chymase bound to heparin is resistant to its natural inhibitors and capable of proteolyzing high density lipoproteins in aortic intimal fluid. *Atherosclerosis* 155, 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00544-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00544-X)
- Longley, B.J., Tyrrell, L., Ma, Y., Williams, D.A., Halaban, R., Langley, K., Lu, H.S., Schechter, N.M., 1997. Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9017–9021.
- Malbec, O., Roget, K., Schiffer, C., Iannascoli, B., Dumas, A.R., Arock, M., Daëron, M., 2007. Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J. Immunol.* 178, 6465–6475.
- Matsumura, S., Iwanaga, S., Mochizuki, S., Okamoto, H., Ogawa, S., Okada, Y., 2005. Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Journal of Clinical Investigation* 115, 599–609. <https://doi.org/10.1172/JCI22304>
- Miyauchi, T., Yanagisawa, M., Tomizawa, T., Sugishita, Y., Suzuki, N., Fujino, M., Ajisaka, R., Goto, K., Masaki, T., 1989. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 2, 53–54.
- Molderings, G.J., Haenisch, B., Brettner, S., Homann, J., Menzen, M., Dumoulin, F.L., Panse, J., Butterfield, J., Afrin, L.B., 2016. Pharmacological treatment options for mast cell activation disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389, 671–694. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1247-1>
- Moore, J.E., James, G.W., 1953. A simple direct method for absolute basophil leucocyte count. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82, 601–603.
- Morita, E., Yasue, H., Yoshimura, M., Ogawa, H., Jougasaki, M., Matsumura, T., Mukoyama, M., Nakao, K., 1993. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 88, 82–91. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.88.1.82>

- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 3448–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
- Oyamada, S., Bianchi, C., Takai, S., Chu, L.M., Sellke, F.W., 2011. Chymase Inhibition Reduces Infarction and Matrix Metalloproteinase-9 Activation and Attenuates Inflammation and Fibrosis after Acute Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339, 143–151. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.179697>
- Patten, R.D., Aronovitz, M.J., Deras-Mejia, L., Pandian, N.G., Hanak, G.G., Smith, J.J., Mendelsohn, M.E., Konstam, M.A., 1998. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am. J. Physiol.* 274, H1812-1820.
- Prabhu, S.D., Frangogiannis, N.G., 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation Research* 119, 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- Qian, L., Van Laake, L.W., Huang, Y., Liu, S., Wendland, M.F., Srivastava, D., 2011. miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 549–560. <https://doi.org/10.1084/jem.20101547>
- Reed, G.W., Rossi, J.E., Cannon, C.P., 2017. Acute myocardial infarction. *The Lancet* 389, 197–210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30677-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30677-8)
- Schirone, L., Forte, M., Palmerio, S., Yee, D., Nocella, C., Angelini, F., Pagano, F., Schiavon, S., Bordin, A., Carrizzo, A., Vecchione, C., Valenti, V., Chimenti, I., De Falco, E., Sciarretta, S., Frati, G., 2017. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2017/3920195>
- Semaan, W., Desbiens, L., Houde, M., Labonté, J., Gagnon, H., Yamamoto, D., Takai, S., Laidlaw, T., Bkaily, G., Schwertani, A., Pejler, G., Levesque, C., Desjardins, R., Day, R., D'Orléans-Juste, P., 2015. Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1–31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochemical Pharmacology* 94, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.02.001>
- Sergeeva, I.A., Hooijkaas, I.B., Van Der Made, I., Jong, W.M.C., Creemers, E.E., Christoffels, V.M., 2014. A transgenic mouse model for the simultaneous monitoring of ANF and BNP gene activity during heart development and disease. *Cardiovascular Research* 101, 78–86. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt228>
- Setsuta, K., Seino, Y., Tomita, Y., Nejima, J., Takano, T., Hayakawa, H., 1995. Origin and Pathophysiological Role of Increased Plasma Endothelin-1 in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Angiology* 46, 557–565. <https://doi.org/10.1177/000331979504600702>
- Shohet, R.V., Kisanuki, Y.Y., Zhao, X.-S., Siddiquee, Z., Franco, F., Yanagisawa, M., 2004. Mice with cardiomyocyte-specific disruption of the endothelin-1 gene are resistant to hyperthyroid cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2088–2093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307159101>

- Spath, N.B., Mills, N.L., Cruden, N.L., 2016. Novel cardioprotective and regenerative therapies in acute myocardial infarction: a review of recent and ongoing clinical trials. *Future Cardiology* 12, 655–672. <https://doi.org/10.2217/fca-2016-0044>
- Sridharan, G., Shankar, A., 2012. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 16, 251. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>
- Sukenaga, Y., Kamoshita, K., Takai, S., Miyazaki, M., 2002. Development and Application of Chymase Inhibitors: Development of the Chymase Inhibitor as an Anti-Tissue-Remodeling Drug: Myocardial Infarction and Some Other Possibilities. *The Japanese Journal of Pharmacology* 90, 218–222. <https://doi.org/10.1254/jjp.90.218>
- Takahashi, M., Matsushita, Y., Iijima, Y., Tanzawa, K., 1993. Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J. Biol. Chem.* 268, 21394–21398.
- Takai, S., Jin, D., Muramatsu, M., Okamoto, Y., Miyazaki, M., 2004. Therapeutic applications of chymase inhibitors in cardiovascular diseases and fibrosis. *European Journal of Pharmacology* 501, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.08.040>
- Tchougounova, E., Pejler, G., Åbrink, M., 2003. The Chymase, Mouse Mast Cell Protease 4, Constitutes the Major Chymotrypsin-like Activity in Peritoneum and Ear Tissue. A Role for Mouse Mast Cell Protease 4 in Thrombin Regulation and Fibronectin Turnover. *The Journal of Experimental Medicine* 198, 423–431. <https://doi.org/10.1084/jem.20030671>
- Tejada, T., Tan, L., Torres, R.A., Calvert, J.W., Lambert, J.P., Zaidi, M., Husain, M., Berce, M.D., Naib, H., Pejler, G., Åbrink, M., Graham, R.M., Lefer, D.J., Naqvi, N., Husain, A., 2016. IGF-1 degradation by mouse mast cell protease 4 promotes cell death and adverse cardiac remodeling days after a myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 6949–6954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603127113>
- Thireau, J., Karam, S., Fauconnier, J., Roberge, S., Cassan, C., Cazorla, O., Aimond, F., Lacampagne, A., Babuty, D., Richard, S., 2012. Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity. *Cardiovascular Research* 95, 59–68. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs167>
- Torbidoni, V., Iribarne, M., Ogawa, L., Prasanna, G., Suburo, A.M., 2005. Endothelin-1 and endothelin receptors in light-induced retinal degeneration. *Experimental Eye Research* 81, 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.12.024>
- van den Borne, S.W.M., van de Schans, V.A.M., Strzelecka, A.E., Vervoort-Peters, H.T.M., Lijnen, P.M., Cleutjens, J.P.M., Smits, J.F.M., Daemen, M.J.A.P., Janssen, B.J.A., Blankesteyn, W.M., 2009. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 84, 273–282. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp207>
- Wang, C., Zhu, K., Guo, C., Li, J., Wang, L., Wang, Y., Lai, H., 2014. Nanovector-based prolyl hydroxylase domain 2 silencing system enhances the efficiency of stem cell transplantation for infarcted myocardium repair. *International Journal of Nanomedicine* 5203. <https://doi.org/10.2147/IJN.S71586>

- Wehrens, X.H.T., Doevendans, P.A., 2004. Cardiac rupture complicating myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 95, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2003.06.006>
- Welle, M., 1997. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J. Leukoc. Biol.* 61, 233–245.
- Wernersson, S., Pejler, G., 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology* 14, 478–494. <https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., Yanagisawa, M., 1994. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78, 473–485.