



MODÉLISATION DE LA RIGIDITÉ ET DE LA PERMÉABILITÉ
DES GRANDS TRONCS ARTÉRIELS

par

PAUL FARAND, M.D.

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M.Sc.)

AUTOMNE 2004

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION.....	21
<i>Chapitre 2 : Modélisation mathématique de la rigidité des grands troncs artériels</i>	
.....	21
<i>Chapitre 3 : Étude morphologique et histologique des parois des grands troncs artériels</i>	
.....	22
<i>Chapitre 4 : Étude de la filtration de macromolécules au travers de la paroi artérielle</i>	
.....	22
<i>Chapitre 5 : Détermination du coefficient de partition de l'albumine pour les globules rouges</i>	
.....	23
<i>Chapitre 6 : Influence du flot artériel pulsé versus continu sur la physiologie</i>	
.....	23
2. MODÉLISATION MATHÉMATIQUE DE LA RIGIDITÉ DES GRANDS TRONCS ARTÉRIELS.....	26
2.1. La rigidité artérielle.....	26
2.1.1. Importance de la rigidité artérielle.....	26
2.1.2. Quelques notions de base dans le domaine de la rigidité artérielle.....	30
2.1.3. Mécanismes physiopathologiques afin d'expliquer la rigidité artérielle.....	34
2.1.4. Avenues thérapeutiques.....	42
2.2. MODÈLE DÉVELOPPÉ.....	44
2.2.1. L'équation de Navier.....	45

2.2.2. Application au problème d'un cylindre creux formé d'une couche de matériel	46
2.2.3. Application au problème d'un cylindre creux formé de plus d'une couche de matériel	50
2.2.4. Inclusion du facteur temps	54
2.3. Discussion	55
3. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DES PAROIS DES GRANDS TRONCS ARTÉRIELS	58
3.1. Problématique	58
3.2. Étude de la couche de surface des cellules endothéliales (CSCE).....	59
3.2.1. Quelques mots sur les protéoglycans.....	59
3.2.2. La couche de surface des cellules endothéliales (CSCE) comme étant une barrière à la filtration des macromolécules.....	61
3.2.3. La couche de surface des cellules endothéliales (CSCE) en lien avec diverses pathologies	64
3.2.4. Épaisseur la couche de surface des cellules endothéliales (CSCE)	68
3.2.5. Protocole de coloration des protéoglycans au Ruthénium red.....	70
3.2.6. Discussion.....	78
3.3. Étude de l'Endothélium	82
3.3.1. La contribution de l'endothélium à la perméabilité	82
3.3.2. Protocole de visualisation de l'endothélium en microscopie électronique à balayage	89

3.3.3. <i>Protocole de visualisation de l'endothélium en microscopie électronique à transmission</i>	94
3.3.4. <i>Protocole de Coloration des cellules endothéliales avec AgNO₃</i>	98
3.3.5. <i>Discussion</i>	101
3.4. <i>Étude de l'espace sous-endothélial</i>	103
3.5. <i>Étude de la Limitante élastique interne (LEI)</i>	105
3.5.1. <i>Implication de la LEI dans le processus de filtration</i>	105
3.5.2. <i>Protocole de digestion de l'aorte</i>	106
3.5.3. <i>Protocole pour l'étude de l'aorte en microscopie confocale</i>	110
3.5.4. <i>Discussion des résultats</i>	113
3.6. <i>Étude de la média</i>	114
3.6.1. <i>Élastine et rigidité</i>	115
3.6.2. <i>Épaisseur de la média</i>	115
3.6.3. <i>Étude de la structure de la média et en particulier de l'élastine</i>	117
3.6.4. <i>Discussions</i>	125
3.7. <i>Étude de l'adventice</i>	128
3.7.2. <i>Mesures de l'épaisseur de l'adventice</i>	129
3.7.3. <i>Moulage de l'aorte et des vasa vasorum</i>	131
3.7.4. <i>Discussion</i>	134
4. ÉTUDE DE LA FILTRATION DE MACROMOLÉCULES AU TRAVERS DE LA PAROI ARTÉRIELLE	138
4.1. <i>Modèles actuels de filtration</i>	138

4.1.1. <i>La modélisation des couches de la paroi artérielle</i>	139
4.1.2. <i>Certains concepts importants des modèles</i>	143
4.1.3. <i>La modélisation du sang</i>	146
4.1.4. <i>Pression différentielle utilisée</i>	147
4.1.5. <i>Résumé des résultats des modèles de filtration</i>	148
4.2. <i>Protocoles de filtration</i>	151
4.2.1. <i>Expérimentations antérieures de filtration au travers des parois artérielles</i>	151
4.3. <i>Données antérieures pour déterminer les paramètres de l'expérience</i>	155
4.3.2. <i>Protocole de filtration in vivo avec BSA-FITC</i>	158
4.3.3. <i>Protocole de filtration in vitro avec BSA-FITC</i>	159
4.4. <i>Protocoles d'observation</i>	163
4.4.1. <i>Observation en microscopie à fluorescence</i>	163
4.4.2. <i>Protocole de fixation et de préparation des tissus pour immunocytochimie</i>	165
4.4.3. <i>Immunocytochimie</i>	168
4.4.4. <i>Observation en microscopie électronique</i>	172
4.5. <i>Étude de viabilité des cellules musculaires lisses et de l'endothélium</i>	179
4.5.2. <i>Discussion</i>	182
4.6. <i>Discussion</i>	183
4.6.1. <i>Causes d'erreur avec le protocole actuelle</i>	183
4.6.2. <i>Suite à prévoir à ces expérimentations</i>	189

5. DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE PARTITION DE L'ALBUMINE POUR LES GLOBULES ROUGES	193
5.1. Introduction du coefficient de partition de l'albumine	193
5.1.1. <i>Développements à partir de la première loi de FICK.....</i>	<i>194</i>
5.2. Protocoles.....	196
5.2.1. <i>Protocole pour la préparation des échantillons</i>	<i>196</i>
5.3. Discussion	207
5.3.1. <i>Critiques de l'expérience actuelle.....</i>	<i>207</i>
5.3.2. <i>Expériences futures à prévoir afin de mesurer la perméabilité des globules rouges.....</i>	<i>211</i>
6. INFLUENCE DU FLOT ARTÉRIEL PULSÉ VERSUS CONTINU SUR LA PHYSIOLOGIE	214
6.1. Cadre dans lequel s'inscrit le présent protocole.....	214
6.2. Différence entre la physiologie en flot pulsé et continu : les connaissances actuelles.....	219
6.2.1. <i>Études comparatives sur le devenir global des patients.....</i>	<i>219</i>
6.2.2. <i>Différences sur l'endothélium.....</i>	<i>219</i>
6.2.3. <i>Différences sur la physiologie cardiaque</i>	<i>220</i>
6.2.4. <i>Différences en ce qui concerne les grands troncs artériels.....</i>	<i>221</i>
6.2.5. <i>Différences sur la physiologie rénale</i>	<i>222</i>
6.2.6. <i>Différences sur la physiologie endocrinienne.....</i>	<i>225</i>

6.2.7. Différences au niveau pulmonaire	226
6.2.8. Différences au niveau hépatique	227
6.2.9. Différences sur la physiologie cérébrale	227
6.2.10. Systèmes de régulation.....	228
6.2.11. Progression ou régression de l'athérosclérose.....	229
6.2.12. Impact sur la fonction immunitaire.....	230
6.2.13. Impact sur les fonctions de coagulation.....	231
6.2.14. Modélisations mathématiques de comparaison des flots pulsés et continus	231
6.3. Montage du protocole expérimental	232
6.3.2. Déroulement du protocole.....	234
6.3.3. Mesures hémodynamiques	235
6.3.4. Mesures des paramètres physiologiques nous intéressant.....	237
6.3.5. Autres avenues de recherche à considérer.....	244
6.4. Discussion	246
7. CONCLUSION.....	248
8. REMERCIEMENTS	250
9. BIBLIOGRAPHIE.....	253

LISTE DES PRÉSENTATIONS

- Automne 2001 Journée de la recherche, Département de médecine interne, CHUS
Modélisation de la rigidité des grands troncs artériels
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.
- Printemps 2002 Congrès annuel, Société québécoise de néphrologie
Modélisation de la rigidité des grands troncs artériels
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.
- Automne 2002 Journée de la recherche, Département de médecine interne, CHUS
Description des méthodes
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.
- Automne 2003 Journée de la recherche, Département de médecine interne, CHUS
Évolution de recherche
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.
- Printemps 2004 Congrès annuel, Société québécoise de néphrologie
(A été présenté par Dr GE Plante)
Fonction endothéliale de la paroi aortique
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.

- 23 septembre 2004 Congrès annuel, Club de recherche clinique du Québec
Modélisation des structures, rigidité et perméabilité des gros troncs artériels (affiche)
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.
- 23 septembre 2004 Congrès annuel, Club de recherche clinique du Québec
Hémoglobine et protéines intra-érythrocytaires (affiche)
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.
- Décembre 2004 Les XXIVes journées de l'HTA, Société française d'hypertension artérielle (Paris, France)
(A été présenté par Dr GE Plante)
Modélisation et étude de la structure, de la rigidité et de la perméabilité des gros troncs artériels (affiche)
FARAND, P., GARON, A., PLANTE, G.E.

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 CYLINDRE CREUX COMPOSÉ D'UNE COUCHE DE MATÉRIEL EN COORDONNÉES CYLINDRIQUES.....	47
FIGURE 2 CYLINDRE CREUX COMPOSÉ DE PLUS D'UNE COUCHE DE MATÉRIEL EN COORDONNÉES CYLINDRIQUES.....	51
FIGURE 3 SIMULATION SUR MATHLAB D'UNE ANALYSE DES CONTRAINTES EN FONCTION DU RAYON.....	53
FIGURE 4 SURFACE DE L'ENDOTHÉLIUM DE L'AORTE THORACIQUE DE LAPIN	73
FIGURE 5 SURFACE DE L'ENDOTHÉLIUM DE L'AORTE THORACIQUE DE LAPIN	74
FIGURE 6 RÉSEAU DE FIBRINE AVEC ACIDE HYALURONIQUE.....	76
FIGURE 7 COLORATION AU RUTHÉNIUM RED DU RÉSEAU DE FIBRINE	77
FIGURE 8 AXES POUR DÉCRIRE LA DIRECTION DU FLOT	91
FIGURE 9 ENDOTHÉLIUM DE L'AORTE THORACIQUE DE LAPIN.....	91
FIGURE 10 ENDOTHÉLIUM DE L'AORTE THORACIQUE DE LAPIN AU REPOS	92

FIGURE 11 ENDOTHÉLIUM LÉGÈREMENT ENDOMMAGÉ DE L'AOORTE THORACIQUE DE LAPIN	93
FIGURE 12 ENDOTHÉLIUM DE L'AOORTE THORACIQUE DE LAPIN (MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION).....	96
FIGURE 13 ENDOTHÉLIUM DE L'AOORTE THORACIQUE DE RAT (MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION).....	97
FIGURE 14 ENDOTHÉLIUM DE L'AOORTE THORACIQUE DE LAPIN AVEC COLORATION À $AgNO_3$.....	101
FIGURE 15 PORES DE LA LEI DE L'AOORTE DE LAPIN (MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE)	109
FIGURE 16 FIBRES DE LA LEI DE L'AOORTE DE LAPIN (MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE)	110
FIGURE 17 PORES DE LA LEI DE L'AOORTE DE LAPIN (MICROSCOPIE CONFOCALE).....	112
FIGURE 18 PAROI DE L'AOORTE THORACIQUE DE LAPIN.....	116
FIGURE 19 MÉDIA DE L'AOORTE THORACIQUE DE LAPIN.....	117
FIGURE 20 STRUCTURE DE LA MÉDIA DE L'AOORTE THORACIQUE DE LAPIN (MICROSCOPIE À TRANSMISSION).....	119

FIGURE 21 STRUCTURE DE LA MÉDIA DE L’AORTE THORACIQUE DE LAPIN (MICROSCOPIE À TRANSMISSION).....	120
FIGURE 22 COUCHES ÉLASTIQUES DE L’AORTE THORACIQUE DE LAPIN	121
FIGURE 23 FIBRES DE LA MÉDIA DE L’AORTE THORACIQUE DE LAPIN (MICROSCOPIE CONFOCALE)	122
FIGURE 24 ÉLASTINE DE L’AORTE THORACIQUE DE LAPIN (MICROSCOPIE CONFOCALE)	123
FIGURE 25 FIBRES ÉLASTIQUES DE LA PAROI EXTERNE DE L’AORTE THORACIQUE DE LAPIN.....	124
FIGURE 26 FIBRES ÉLASTIQUES DE LA PAROI EXTERNE DE L’AORTE THORACIQUE DE LAPIN.....	125
FIGURE 27 ORGANISATION GÉNÉRALE PROPOSÉE DES FIBRES D’ÉLASTINE DE L’AORTE.....	126
FIGURE 28 JONCTION MÉDIA-ADVENTICE, AORTE THORACIQUE DE LAPIN (M. À TRANSMISSION).....	130
FIGURE 29 MOULAGE DE L’AORTE THORACIQUE DISTALE DE LAPIN.....	133

FIGURE 30 COUPE RADIALE D'UN VASA VASORUM DE L'AORTE THORACIQUE DE RAT	134
FIGURE 31 PREMIER MONTAGE POUR LA FILTRATION CONSTRUIT À L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL	162
FIGURE 32 FILTRATION DE L'ALBUMINE EN MICROSCOPIE À FLUORESCENCE.....	164
FIGURE 33 PRINCIPE DE L'EXPÉRIENCE EN IMMUNOCYTOCHIMIE ...	170
FIGURE 34 FAUX ESPOIRS !.....	173
FIGURE 35 MARQUAGE SANS SPÉCIFICITÉ AU NIVEAU DU SYSTÈME VÉSICULO-TUBULAIRE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES.....	174
FIGURE 36 MARQUAGE SPÉCIFIQUE DE FITC-BSA AU NIVEAU DE L'INTERSTICE DE LA MÉDIA ET DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	175
FIGURE 37 MARQUAGE SPÉCIFIQUE DE FITC-BSA AU NIVEAU DU COLLAGÈNE ET DE L'INTERSTICE DE LA MÉDIA – IN VIVO.....	177
FIGURE 38 MARQUAGE SPÉCIFIQUE DE FITC-BSA AU NIVEAU DU COLLAGÈNE ET DE L'INTERSTICE DE LA MÉDIA – IN VITRO	178

FIGURE 39 COURBE DE RÉACTIVITÉ VASCULAIRE D'UNE AORTE THORACIQUE.....	181
FIGURE 40 MITOCHONDRIES DE L'AORTE DE LAPIN À LA FIN DU PROTOCOLE DE FILTRATION IN VITRO.....	182
FIGURE 41 CHROMATOGRAPHIE PAR ÉCHANGE D'ANIONS DE L'ALBUMINE BOVINE.....	203
FIGURE 42 CHROMATOGRAPHIE PAR ÉCHANGE D'ANIONS DU SANG COMPLET DE LAPIN HÉMOLYSÉ	204
FIGURE 43 CHROMATOGRAPHIE PAR ÉCHANGE D'ANIONS D'UN ÉCHANTILLON DE GLOBULES ROUGES SEULS.....	205
FIGURE 44 CHROMATOGRAPHIE PAR ÉCHANGE D'ANIONS DU PRÉCIPITÉ D'HÉMOGLOBINE	206

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I – MODÈLE MATHÉMATIQUE PRÉSENTÉ PAR JOSÉE MANCEAU ET ANDRÉ GARON AU PRINTEMPS 2002.....	150
TABLEAU II CONTRIBUTIONS PRÉDITES DES COUCHES À LA CHUTE DE CONCENTRATION DE L'ALBUMINE.....	151
TABLEAU III MESURE DU COEFFICIENT DE PARTITION ENTRE L'INTÉRIEUR DES GLOBULES ROUGES (GR) ET LE PLASMA DE LAPIN POUR LES PROTÉINES TOTALES.....	207

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Symboles

ACTH	Hormone adrénocorticotropique
ALT	Alanine aminotransférase
AST	Aspartate aminotransférase
BSA-FITC	Fluoresceine isothiocyanate conjuguée à de l'albumine de sérum bovin
C	Concentration
Ca	Calcium
C_{effectif}	Concentration effective
C_{GR}	Concentration dans les globules rouges
CHUS	Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke
Cl	Chlore
CO ₂	Dioxyde de carbone
C_{plasma}	Concentration dans le plasma
CSCE	Couche de surface des cellules endothéliales
D	Coefficient de diffusion
D_{effectif}	Coefficient de diffusion effectif
D_{plasma}	Coefficient de diffusion du plasma
E	Module élastique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique

FITC	Fluoresceine isothiocyanate
H	Hématocrite
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
ICM	Institut de cardiologie de Montréal
IgG	Immunoglobuline de type G
IgM	Immunoglobuline de type M
INR	International Normalized Ratio Prothrombine Time
K	Potassium
K _{GR}	Coefficient de partition entre les globules rouges et le plasma
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LEI	Limitante élastique interne
LEE	Limitante élastique externe
Mg	Magnésium
N	Flux de particule
Na	Sodium
N _{effectif}	Flux de particule effectif
N _{plasma}	Flux de particule dû au plasma
NO	Oxyde nitrique
P	Phosphore
PAH	<i>para</i> -aminohippurate
PTH	Hormone parathyroïdienne

PWV	Vélocité de l'onde de pouls
SOD	Superoxide dismutase
T ₃	Triiodothyronine
TGF-β	Facteur de croissance tumoral – bêta (Tumor growth factor-beta)
TRH	Hormone de relâche thyrotropique (Thyrotropin-releasing hormone)

RÉSUMÉ

MODÉLISATION DES STRUCTURE, RIGIDITÉ ET PERMÉABILITÉ DES GROS TRONCS ARTERIELS

Farand P¹, Garon A², Plante, GE¹

¹ Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke, ² Département de génie mécanique, École polytechnique de Montréal.

Introduction: Les pathologies cardio-vasculaires sont une cause dominante de mortalité dans les sociétés occidentales. Les mathématiques et les progrès de l'ingénierie, en sus de l'approfondissement de la physiologie et physiopathologie, sont de plus en plus fréquemment utilisés pour venir à bout de ce fléau.

Méthodes: Nous travaillons au développement et à la validation de modèles théoriques décrivant la filtration des macromolécules à travers les différentes couches de la paroi artérielle. À ces fins, nous avons étudié et caractérisé certaines composantes des parois de l'aorte. Aussi, en guise de validation des modèles de filtration, dans des situations contrôlées, nous étudions la distribution de l'albumine exogène marquée du compartiment vasculaire à travers les différentes couches de la paroi d'aortes thoraciques provenant de lapins normaux. Pour ce faire, nous utilisons la microscopie à fluorescence et l'immunocytochimie en microscopie électronique. Enfin, à l'aide de modèles mathématiques, nous étudions les éléments susceptibles d'expliquer le phénomène de rigidité des gros troncs artériels.

Résultats: Nous avons étudié et caractérisé une partie de la couche de surface des cellules endothéliales et l'endothélium luminal aortique. La limitante élastique interne a également été bien étudiée, en particulier la taille des pores de cette dernière ainsi que l'orientation des fibres d'élastine qui la compose. Les résultats préliminaires montrent que les fibres d'élastine de la limitante élastique interne sont majoritairement orientées de manière parallèle à la direction du flot. Au contraire, nos premières observations montrent que les fibres d'élastine de la média sont orientées de manière perpendiculaire à la direction du flot luminal. Enfin, le système *vasa vasorum* de l'adventice de l'aorte thoracique a été étudié. À l'aide de moulage de l'aorte et d'études en microscopie électronique, nos résultats préliminaires montrent que la densité des *vasa vasorum* de l'aorte thoracique est plus grande dans sa paroi postérieure que dans sa paroi antérieure. Pour terminer, nous avons approfondi le rôle des érythrocytes dans la filtration des protéines à travers les parois artérielles en déterminant un coefficient de partition des protéines de 0,204 +/- 0,017 entre l'intérieur des érythrocytes et le plasma.

Conclusions: Les résultats morphologiques obtenus et l'analyse préliminaire des paramètres physiologiques examinés, rejoignent certaines observations disponibles de la littérature. Ces résultats permettront vraisemblablement, d'améliorer les modélisations mathématiques des phénomènes de filtration à travers les parois des grands troncs artériels et du phénomène de la rigidité artérielle. De plus, nous présentons le développement d'une technique de validation quantitative des modèles de filtration.

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Les méfaits des pathologies cardio-vasculaires, notamment comme étant la cause de mortalité la plus répandue au sein des sociétés occidentales, sont bien connues. Il est donc nécessaire d'utiliser tous les outils à notre disposition afin d'améliorer notre compréhension et nos approches de ce problème. Dans ce contexte, les mathématiques et les progrès de l'ingénierie sont de plus en plus fréquemment utilisés afin de développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques afin de venir à bout de ce fléau. On peut ainsi espérer améliorer et faciliter le travail du clinicien. C'est dans ce cadre que certaines avenues de recherches ont été développées.

Nos travaux détaillés ci-bas, traitent tous des propriétés mécaniques de la paroi artérielle ou bien de certains facteurs en mesure d'y entraîner des modifications.

Chapitre 2 : Modélisation mathématique de la rigidité des grands troncs artériels

Nous avons initialement développé un modèle mathématique de la rigidité artérielle en fonction de la structure et de la composition des grands troncs artériels. Cette dernière étant un facteur de morbidité cardio-vasculaire majeur. Nous voulions être en mesure de prédire l'impact d'un changement donné, pathologique ou thérapeutique, sur la rigidité totale de l'artère étudiée. Ce projet ambitieux a toutefois été ralenti une fois le développement mathématique sommaire fait. Effectivement, nous avons dû renoncer à

aller plus loin pour le moment considérant les discordances, sans explications notables pour le moment, entre un de nos développements et les dernières publications sur le sujet. Aussi, il est nécessaire de préciser qu'il manque actuellement d'informations précises en ce qui a trait aux composantes des parois artérielles et de leurs contributions au phénomène de rigidité artériel. De plus, l'échelle de temps du développement des atteintes pathologiques des artères en lien avec l'ensemble des phénomènes de transport de masse qui modifient les propriétés mécaniques de la paroi n'est pas encore bien défini.

Chapitre 3 : Étude morphologique et histologique des parois des grands troncs artériels

Parallèlement au développement du modèle de rigidité, nous avons débuté l'étude de la structure et de la composition des artères. Cela, puisque nous nous rendions bien compte que de nombreux éléments nécessaires à l'élaboration d'un modèle de rigidité valide nous manqueraient. Nous avons donc travaillé à l'étude couche par couche de la structure de l'aorte en nous appuyant sur les caractéristiques des éléments individuels (élastine, collagène, muscles lisses, interstice, ...) qui sont, quant à eux, relativement bien décrits dans la littérature actuelle.

Chapitre 4 : Étude de la filtration de macromolécules au travers de la paroi artérielle

Pouvoir déterminer le devenir d'une substance suite à la filtration au travers des parois des vaisseaux prend une importance grandissante, cela, non seulement dans le domaine

cardio-vasculaire, mais dans presque tous les domaines de la médecine. Dans ce sens, l'intérêt grandissant pour les modèles de filtration de macromolécules au cours des dernières années a influencé notre choix de travailler sur le sujet. Toutefois, bien que plusieurs propositions de modèles existent, d'importantes incertitudes résident en ce qui a trait à la validité des bases utilisées afin de les concevoir et ces limitations restreignent leur utilité en pratique. Ainsi, notre objectif était de tenter de valider certaines parties des modélisations actuelles. Pour ce faire, nous avons fait la conception d'un protocole de filtration d'albumine exogène marquée au travers des parois de l'aorte de lapins sains.

Chapitre 5 : Détermination du coefficient de partition de l'albumine pour les globules rouges

En ce qui a trait au comportement de l'albumine dans le sang, le rôle des globules rouges demeure incertain. Afin de mieux cerner ce rôle, il est nécessaire de déterminer la distribution relative de l'albumine entre les globules rouges et le plasma (coefficient de partition) ainsi que la perméabilité de la membrane du globule rouge pour l'albumine. Pour notre part, nous nous sommes attardés à développer la méthode afin de déterminer le coefficient de partition.

Chapitre 6 : Influence du flot artériel pulsé versus continu sur la physiologie

Finalement, nous nous sommes intéressés au développement des pompes axiales d'assistance ventriculaire en flot continu, principalement en ce qui a trait aux impacts

physiologiques probables d'un flot continu versus pulsé. En rapport avec cela, nous avons effectué une revue de la littérature actuellement disponible sur le sujet pour en arriver à faire l'élaboration d'un protocole de recherche. Ce protocole vise des expériences qui seront faites à plus long terme à l'occasion des essais visant le développement d'une nouvelle pompe d'assistance ventriculaire.

Il est à noter que la plupart des essais décrits actuellement dans la littérature afin de tester in vitro la rigidité des artères ou bien la filtration au travers des parois vasculaires utilisent des flots continus ou des situations statiques. Dans ce contexte, il est important de s'attarder à l'importance du phénomène de pulsatilité du flot sanguin autant dans l'étude du comportement mécanique des artères que pour le fonctionnement des divers organes.

**MODÉLISATION MATHÉMATIQUE DE LA RIGIDITÉ
DES GRANDS TRONCS ARTÉRIELS**

2. MODÉLISATION MATHÉMATIQUE DE LA RIGIDITÉ DES GRANDS TRONCS ARTÉRIELS

Cette partie du projet consiste à utiliser les techniques de modélisation de fluides et de structures afin de concevoir une représentation mathématique sur support informatique des gros vaisseaux chez l'humain. Il faut préciser que la modélisation des phénomènes biologiques est appelée à prendre de plus en plus de place dans la recherche fondamentale et clinique. Elle peut, entre autres, permettre d'éviter les coûts divers et trop nombreux des recherches in vivo. Par exemple, une fois le modèle en place et accepté par les cliniciens, nous aurions voulu tester de manière théorique certaines interventions thérapeutiques qui agissent sur les mécanismes causant l'hypertension et ses effets néfastes.

2.1. LA RIGIDITÉ ARTÉRIELLE

2.1.1. Importance de la rigidité artérielle

De nos jours, nous connaissons bien les méfaits de l'hypertension artérielle en lien avec le développement de nombreuses affections comprenant en premier lieu, les maladies coronariennes, cérébro-vasculaires et rénales. La pathophysiologie la plus fréquente afin

d'expliquer l'hypertension, soit dans 90 % des cas, est l'hypertension dite essentielle. C'est donc dire que nous ne sommes pas en mesure de trouver de cause secondaire, telle sténose des artères rénales ou hyperaldostéronisme, chez la très grande majorité des individus souffrant d'hypertension artérielle. (DOMINO et KAPLAN, 2003).

Récemment, de nouvelles expérimentations humaines et animales ont permis de décortiquer et d'approfondir davantage de nouveaux concepts dans le domaine de l'hypertension. Cela, notamment au niveau de la structure des vaisseaux et des facteurs régissant les mouvements des parois artérielles. Ces données ramènent à la base de la recherche sur l'hypertension, la notion fondamentale de rigidité artérielle. Précisons que ce concept n'est pas nouveau et est un sujet d'intérêt pour les chercheurs comme facteur causal ou conséquence de l'hypertension depuis plus de 100 ans (FOLKOW 1982). Ce concept a été par la suite délaissé quelque peu et reprend une importance majeure dans le domaine de la recherche cardio-vasculaire.

2.1.1.1. Les méthodes de mesure de la rigidité artérielle

La mesure de la tension artérielle (et donc de la pression pulsée puisqu'étant la différence entre la pression systolique et diastolique) est un des examens faits le plus fréquemment en clinique. Toutefois, il nous est possible d'aller chercher d'autres mesures que la pression artérielle en ce qui a trait à la rigidité artérielle. Ces méthodes de mesure sont nombreuses et passées en revue dans PANNIER et al. (2002) et nous ne traiterons que de certaines plus utilisées en clinique ou en recherche.

La vitesse de l'onde de pouls (PWV) est probablement une des mesures non invasive la plus répandue. La technique consiste à mesurer la vitesse de propagation de l'onde de pouls vers la périphérie. Nous décrivons plus loin comment déterminer les paramètres de la rigidité une fois la vitesse de l'onde de pouls déterminée. De manière générale, plus l'onde de pression se déplace rapidement, plus le vaisseau étudié est rigide. Nous pouvons suivre les ondes de pression avec des capteurs de pression ou de flot (doppler) ou bien un appareil d'imagerie en temps réel (BREITHAUPT-GRÖGLER, 1999). Nous pouvons aussi retrouver la PWV à partir de l'analyse de l'onde de pouls. L'onde de pouls périphérique est acquise par tonométrie et est analysée. Sa forme est décomposée en une onde incidente et une onde réfléchie. À l'aide d'un modèle mathématique du réseau artériel, généralement un modèle Windkessel à trois ou quatre éléments modélisant le réseau artériel à l'aide des composantes d'un circuit électrique, les caractéristiques du système artériel sont retrouvées (DAVIES et STRUTHERS, 2003).

En ce qui concerne les techniques utilisant des techniques échographiques, ces dernières utilisent soit des sondes intravasculaires (BANK, 1999) ou extravasculaires. Les sondes intravasculaires nous permettent d'obtenir des valeurs beaucoup plus précises des caractéristiques mécaniques et géométriques in vivo des artères. Toutefois, cela est au prix d'un accès intravasculaire artériel. Les techniques d'échographie extravasculaire non invasive nous permettent d'obtenir des mesures de changement de volume par rapport au déplacement et il est possible à l'aide de modèles mathématiques de retrouver

la compliance et les modules élastiques correspondants (STARMANS-KOOL et VAN BORTEL, 1999).

2.1.1.2. Importance clinique

L'importance de s'intéresser à la rigidité artérielle est d'autant plus grande depuis que nous savons que cette dernière est un prédicteur de mortalité cardio-vasculaire indépendant des autres facteurs de risque connus, dont l'hypertension. Effectivement, de nombreuses études démontrent que l'augmentation de la pression pulsée, l'augmentation de la vitesse de l'onde de pouls et l'augmentation du module élastique carotidien incrémenté sont des prédicteurs indépendants de mortalité cardio-vasculaire et d'événements cardio-vasculaires. Ces études sont présentées en revue par SAFAR (2001). Depuis, une nouvelle étude allant dans le même sens a été publiée, soit l'étude NHANES I (DOMANSKI et al., 2001) concernant la pression pulsée. De plus, les résultats de la plus grosse étude de suivi sur le sujet (MRFIT), avec plus de 340 000 hommes pour un suivi moyen de 22 ans, ont été récemment publiés. Cette dernière a montré que bien que la pression pulsée soit aussi un prédicteur de mortalité cardio-vasculaire, ce dernier facteur est moins prédictif de mortalité s'il n'est pas associé à une augmentation de la pression artérielle (DOMANSKI et al., 2002). Toutefois, chez des patients très à risque d'événements cardio-vasculaires comme des insuffisants rénaux, malgré des pressions artérielles normales, l'augmentation de la vitesse de l'onde de pouls (PWV) est reliée à la survenue d'incidents cardio-vasculaires (LONDON et COHN, 2002) (SAFAR et al., 2004).

L'importance de s'intéresser à la rigidité artérielle vient aussi du fait que cette dernière se présente avant l'apparition de l'hypertension sur des modèles animaux de rats spontanément hypertendus et soumis à des diètes riches en sel (ET-TAOUIL et al., 2001). En ce qui a trait aux études chez l'humain, BENETOS et al. (1997) ont observé, chez plus de 19 000 hommes suivis pendant 20 ans, que l'augmentation de la pression pulsée, un marqueur de la rigidité artérielle, est un prédicteur de mortalité cardiovasculaire même chez les sujets normotendus.

2.1.2. Quelques notions de base dans le domaine de la rigidité artérielle

Cette section a pour objectif de réviser de manière très générale certains concepts à la base de la rigidité artérielle. Le lecteur qui voudra en connaître davantage pourra se référer aux références données dans cette section et la suivante.

2.1.2.1. Onde de pouls réfléchie

Intuitivement, il est aisé de concevoir qu'au moment de la systole cardiaque, une onde de pouls soit transmise dans le réseau artériel. Toutefois, la pression artérielle résultante doit aussi tenir compte de l'onde de pouls qui sera réfléchie en provenance de la périphérie (O'ROURKE et al., 2002) probablement en raison du fait que les artères musculaires périphériques sont moins rigides que les grands troncs artériels. Cette onde de pouls a une importance majeure selon son intensité et la vitesse de son retour. Effectivement, dans le cas de personnes jeunes, l'onde réfléchie sera à la fin de la

systole formant l'onde dicrotique à laquelle nous sommes habitués. Toutefois, chez une personne plus âgée, qui a des artères plus rigides, l'onde réfléchie reviendra plus rapidement et sera en phase avec l'onde incidente (FRANKLIN, 1999). La résultante sera une augmentation de la pression systolique et une diminution de la pression diastolique, entraînant par le fait même une augmentation de la pression pulsée. Cela peut avoir des implications majeures sur des phénomènes dépendants de la pression diastolique, notamment une diminution du remplissage coronarien fait majoritairement en diastole, pouvant augmenter ou entraîner de l'ischémie myocardique.

2.1.2.2. La vitesse de l'onde de pouls (PWV)

La PWV (m/s) peut être reliée aux autres paramètres de la rigidité artérielle à l'aide de l'équation de Moens-Korteweg, soit :

$$(PWV)^2 = \frac{Eh}{2\rho R}$$

Où E est le module élastique (N/m²), h est l'épaisseur de la paroi (m), ρ est la masse spécifique du sang (kg/m³) et R est le rayon interne du vaisseau étudié (m) (LEVY, 1999).

2.1.2.3. Compliance

Cette dernière notion se réfère à la relation entre le changement de volume en rapport à un changement de pression.

$$\text{Compliance} = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

Où ΔV correspond au changement de volume et ΔP au changement de pression. Notons que cette mesure se réfère de manière plus fréquente au contexte d'une cavité comme un ventricule cardiaque. L'application de cette mesure n'est pas directe en ce qui a trait aux artères, mais il est possible de faire certaines transformations aux équations afin de relier la compliance artérielle au module élastique (LEHMANN, 1999).

2.1.2.4. Matériaux linéaires

Dans les matériaux linéaires, une relation linéaire existe entre les contraintes, notées σ (N/m^2) et les déformations, notées ε (souvent en allongement relatif). À l'intérieur du matériel, la pente de la droite des contraintes en fonction des déformations est alors égale à une constante qui est égale au module de Young, noté E (N/m^2). Cette relation s'écrit en notation covariante (FLÜGGE, 1972) :

$$\sigma^{ij} = E^{ijlm} \varepsilon_{lm}$$

Si ce module élastique est constant dans tout le matériel étudié, nous sommes en mesure d'affirmer que ce matériel est homogène. Ce dernier sera aussi qualifié d'isotrope si la relation entre les contraintes et les déformations ne change pas si les forces sont appliquées dans une direction différente ou bien si le système de référence est modifié.

Cela dit, nous pouvons relier les contraintes σ à d'autres équivalences que nous connaissons mieux, soit :

$$\sigma = \frac{T}{h}$$
$$T = PR$$

Où T est la tension dans la paroi et peut se retrouver selon la loi de Laplace rappelée ici, R est le rayon interne du vaisseau et h est l'épaisseur du vaisseau étudié.

Toutefois, nous savons intuitivement que la paroi artérielle a un comportement qui n'est pas linéaire considérant que la relation entre les déformations et les contraintes n'est pas linéaire selon les pressions appliquées sur les parois (NICHOLS et O'ROURKE, 1990). Nous avons donc eu besoin d'introduire la notion de module élastique incrémenté (Einc) qui est valide uniquement pour une valeur précise de déformation. La mesure in vivo du module élastique incrémenté demeure toutefois difficile à part dans le contexte de l'échographie intravasculaire. Il a donc été nécessaire de construire un module élastique approximé et ajusté spécifiquement aux artères (LEHMANN, 1999).

Aussi, le cas des artères est aussi particulier dans le cadre que ces dernières possèdent un caractère viscoélastique (LEVY, 1999). C'est donc dire que le comportement de ces dernières est différent selon que la condition soit statique ou dynamique. La pente des contraintes sur les déformations sera moins grande dans une condition dynamique que

statique (SAFAR et al., 1998). C'est donc dire que la paroi artérielle aura un comportement plus rigide avec une augmentation de la fréquence cardiaque.

Dans le cas des grands troncs artériels, nous sommes dans une situation où le module de Young résultant aura la contribution des modules élastiques de chacune des composantes de la paroi artérielle et de leur distribution relative au sein de chacune des couches de la paroi. Par exemple, nous savons que le module de Young du collagène est plus grand que celui de l'élastine (O'ROURKE, 1999). Selon les données de SEGERS et VERDONCK (1998), le module élastique du collagène serait de 10 Mpa et celui de l'élastine d'environ 600 kPa. En ce qui a trait aux cellules musculaires lisses, il est plus difficile de se prononcer sur la valeur du module élastique puisque cela dépend grandement de l'état de contraction du vaisseau.

2.1.3. Mécanismes physiopathologiques afin d'expliquer la rigidité artérielle

2.1.3.1. Vieillesse

L'effet du vieillissement sur les gros troncs artériels est maintenant reconnu comme étant une des causes principales de rigidité artérielle. La rigidification des artères due au vieillissement pourrait aussi expliquer l'hypertension systolique isolée retrouvée chez les personnes âgées (O'ROURKE, 1999). Effectivement, cette forme d'hypertension artérielle est probablement secondaire au retour précoce de l'onde de pouls réfléchie dans des grands troncs artériels âgés. L'hypothèse avancée concernant la

pathophysiologie de l'augmentation de rigidité des grands troncs artériels avec l'âge est l'affaiblissement des couches d'élastine avec le temps, ce qui résulte à transférer de l'élastine vers le collagène la responsabilité de tolérer les déformations (NICHOLS et O'ROURKE, 1990). Nous reviendrons sur la structure de l'élastine dans la média au chapitre 3.

2.1.3.2. Sexe

BREITHAUPT-GRÖGLER et BELZ (1999) ont rapporté de nombreux groupes qui ont observé que les femmes préménopausées avaient une rigidité artérielle plus basse que les femmes ménopausées et les hommes du même âge. Ces changements seraient probablement secondaires non seulement aux œstrogènes, mais aussi probablement à des modifications structurales des artères.

2.1.3.3. Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle en tant que telle induirait aussi probablement des changements au niveau des artères de gros calibres indépendamment de la cause initiale. L'hypothèse avancée serait que les pressions élevées et la distension des artères obligeraient un transfert de la responsabilité de tolérer les déformations de l'élastine vers le collagène considérant leurs distributions différentes et leurs modules élastiques différents (BREITHAUPT-GRÖGLER et BELZ, 1999). Le module élastique du collagène étant évalué à 10 MPa et celui de l'élastine à 600 kPa (SEGERS et VERDONCK, 1998).

2.1.3.4. Composition et structure des artères

La composition des parois artérielles a une influence certaine sur la rigidité. En rapport à cela, il est généralement accepté que l'augmentation de collagène au sein de la paroi est reliée à une augmentation de la rigidité de l'artère (SAFAR et al., 1998). Toutefois, de nouvelles données chez l'animal indiquent que les protéoglycans (Hyaluronan) ont une importance égale, sinon plus, en ce qui a trait à la rigidité des artères (ET-TAOUIL et al., 2001). Effectivement, ce groupe a observé que les vaisseaux des rats soumis à une diète élevée en sel avaient un contenu moindre en hyaluronane et une compliance moindre. Ces altérations étaient partiellement renversées par le traitement avec un diurétique thiazidique. À noter que les rats avaient une pression artérielle normale et que le contenu en collagène des vaisseaux était inchangé au cours de l'expérimentation.

L'augmentation de la composition en calcium a aussi été reliée à une augmentation de la rigidité artérielle (ATKINSON 1999). Cette augmentation de la composition en calcium se retrouve dans de nombreuses situations pathophysiologiques, dont en insuffisance rénale (BLACHER et al., 2001).

La structure même des artères est aussi probablement importante afin d'expliquer les changements en ce qui concerne la rigidité. Cela en plus des changements en élastine et en collagène tels que décrits précédemment. Effectivement, la grande majorité des groupes ont rapporté une diminution du ratio média sur lumière. Les méthodes de

mesure de cette condition sont toutefois discutables et il faut toujours remettre l'observation dans son contexte (SAFAR et al., 1998).

2.1.3.5. L'influence des cellules musculaires lisses

L'organisation des cellules musculaires lisses elle-même pourrait avoir une importance; effectivement, nous savons que l'aorte contient des cellules musculaires lisses orientées de manière longitudinale, oblique et circulaire (KO et al., 2001). Il est probable que les contractions soutenues des cellules musculaires lisses, principalement de type circulaire, pourraient contribuer au phénomène de la rigidité artérielle. Toutefois, la contribution des cellules musculaires lisses à la rigidité totale de l'artère est moindre dans les grands troncs artériels qu'au niveau des artères périphériques (NICHOLS et O'ROURKE, 1990).

2.1.3.6. Influence du système rénine-angiotensine-aldostérone-sodium

De nombreuses évidences sont présentes à savoir que l'apport riche en sodium est en mesure d'entraîner des modifications de la composition et de la structure artérielle et d'augmenter la pression artérielle. Adopter une diète faible en sel est même parmi les premières interventions proposées par les protocoles de traitement de l'hypertension (DOMINO et KAPLAN, 2003). De plus, nous savons qu'une dérégulation de l'axe de la rénine-angiotensine-aldostérone est impliquée dans le mécanisme de l'hypertension artérielle. Une revue du sujet a été récemment publiée (GENEST, 2001).

2.1.3.7. Influence de la fréquence cardiaque et de l'onde de pression réfléchie

Il est bien établi qu'une augmentation de la fréquence cardiaque peut entraîner des changements en ce qui concerne la pression artérielle indépendamment des changements neurohumoraux souvent associés (ALBALADEJO et al. 2001). Une des explications serait que l'onde de pouls réfléchie revienne plus rapidement en provenance de la périphérie. Il n'y a pas de changement en ce qui concerne la rigidité en aigu, mais il y en aurait probablement de manière chronique. Effectivement, le groupe de TROPEA et al. (2000) ont contenu in vivo des aortes de lapins avec des bandes et ont observé que les aortes qui n'étaient plus soumises à l'effet pulsé avaient moins de formation de plaques intimes, indicatrices d'un processus athérosclérotique et de changements mécanique en faveur d'une artère plus rigide.

2.1.3.8. Influences génétiques et environnementales

Il existe certaines prédispositions pour avoir une rigidité artérielle augmentée. Par exemple, les gens d'origine orientale ont une aorte dont le diamètre est plus grand et dont la média est plus mince de manière relative. En utilisant la loi de Laplace décrite précédemment, nous sommes en mesure d'inférer que le stress sur les parois artérielles de ces patients est augmenté tout comme la PWV. En excluant les facteurs environnementaux, sur une base structurale, les gens d'origine orientale ont une chance plus grande de développer une hypertension artérielle (AVOLIO, 1995).

En ce qui a trait à certains facteurs génétiques reliés à quelques gènes en particulier, le groupe de BENETOS et al. (1995) a démontré que certains allèles du gène de l'AT1 prédisposent à une augmentation du cholestérol et de la rigidité artérielle. Certaines hypothèses sont à l'effet que ces effets seraient le résultat d'un effet sur le collagène (BENETOS et SAFAR, 1995). Effectivement, le blocage de l'angiotensine entraîne une diminution de l'accumulation du collagène dans les parois artérielles (ALBALADEJO et al., 1994).

2.1.3.9. Influences neurohumorales

Les influences neurohumorales peuvent jouer un rôle très important dans la pathophysiologie de la rigidité artérielle. Effectivement, la plupart des peptides émis en cas de stress (entre autres, norépinéphrine et Angiotensine II) ont des effets vasomoteurs ayant des impacts directs sur la rigidité artérielle. De plus, les états de stress physiques et psychologiques entraînent une résistance à l'insuline et des changements au niveau immunitaire qui peuvent avoir des effets sur la rigidité (PLANTE, 2002).

2.1.3.10. L'influence du diabète et des désordres lipidiques

Plusieurs études épidémiologiques et animales montrent que l'insuline peut avoir un impact sur la rigidité artérielle. En complément à ces études, WESTERBACKA et al. (1999) ont infusé de l'insuline à des êtres humains sans diabète en mesurant la rigidité artérielle à l'aide de tonométrie. Ces derniers n'ont pas observé d'augmentation de rigidité artérielle et, à l'inverse, probablement même une augmentation de la compliance

des grands troncs artériels pendant l'infusion. Les auteurs concluent alors que c'est probablement la résistance à l'insuline en tant que telle qui entraîne l'augmentation de la rigidité des grands troncs artériels.

En ce qui a trait aux désordres lipidiques, le groupe de GIANNATTASIO et al. (1999) a démontré que la rigidité artérielle est augmentée chez les sujets humains avec hypercholestérolémie en comparant avec un groupe contrôle. Cela, pour des mêmes valeurs de pression artérielle. Nous ne savons toutefois pas si un traitement avec des hypocholestérolémiants diminue la rigidité artérielle chez ces patients.

2.1.3.11. Microcirculation de l'adventice (vasa vasorum)

Le réseau des vasa vasorum peut être impliqué dans le processus de rigidité artérielle. Effectivement, comme nous y reviendrons dans le chapitre 3, des relations existent entre le développement de l'athérosclérose et les vasa vasorum. Toutefois, en plus de cela, ET-TAOUIL et al. (2003) rapportent les résultats d'expériences où les vasa vasorum avait été retirés, résultant alors en une augmentation de la rigidité de l'artère étudiée (STEFANADIS et al., 1995). De plus, certaines autres conditions reliées aux vasa vasorum pourraient influencer la rigidité artérielle, comme par exemple, l'augmentation de flot très importante possible au niveau des vasa vasorum et pouvant être reliée à certains états pathologiques (OHHIRA et OHHASHI, 1992).

Enfin, il est à noter qu'avec l'âge, certaines données citées par BREITHAUPT-GRÖGLER et BELZ (1999) nous indiquent que les vasa vasorum se font plus rares avec le vieillissement. Est-ce que cela pourrait entraîner la raréfaction des fibres élastiques observée avec l'âge dans la média externe et ainsi contribuer à la rigidité artérielle ?

2.1.3.12. Les propriétés de l'endothélium

Les cellules endothéliales jouent un rôle important en ce qui a trait au contrôle des propriétés viscoélastiques de la paroi artérielle. La revue de SAFAR et al. (1998) est claire à ce sujet et nous laisse en référence certaines expérimentations où le comportement de l'aorte avait été étudié suite au retrait de l'endothélium. Les aortes désendothélialisées emmagasinent plus de sang à une PWV moindre. Ces dernières n'étaient plus en mesure d'effectuer leurs tâches de transport adéquatement.

2.1.3.13. Autres facteurs

Parmi ces autres facteurs pouvant influencer la rigidité artérielle, il est nécessaire de noter les niveaux élevés d'homocysteine qui ont été corrélés de manière indépendante à la PWV chez l'humain (BORTOLOTTI, L.A., 1999).

Le groupe de KOOL et al. (1993) a étudié la rigidité des artères suite à l'utilisation de cigarettes chez des patients fumeurs. Ces derniers ont observé une augmentation en aigu de la rigidité mais pas d'augmentation soutenue.

2.1.4. Avenues thérapeutiques

2.1.4.1. Avenues non pharmacologiques

De nombreuses avenues non pharmacologiques sont avancées. L'exemple le plus clair est la réduction de l'apport sodé dans la diète (DOMINO et KAPLAN, 2003). Toutefois, il ne faut pas négliger l'importance de l'exercice physique et le maintien d'un poids santé afin de réduire l'insulinorésistance. De plus, il est fort probablement opportun de gérer de manière adéquate les stressseurs psychologiques afin de réduire la rigidité artérielle (PLANTE, 2002)

2.1.4.2. Avenues pharmacologiques

De nombreux essais ont été faits afin de tester l'influence que pourrait avoir la modulation pharmacologique de la rigidité artérielle. GIRERD et al. (1991) ont publié les premières données que nous avons retrouvées d'essai thérapeutique chez l'humain visant la baisse de la PWV. Ces derniers ont remarqué que les bloqueurs des canaux calciques ainsi que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine diminuaient la vélocité de l'onde de pouls. Une des explications possible en ce qui a trait à l'effet de l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine est son action via la prévention de l'accumulation de collagène dans la paroi artérielle tel que démontré chez le rat (ALBALADEJO et al., 1994). En ce qui a trait au traitement d'une pression pulsée augmentée, nous devons ajouter à ces médications les nitrates et certains diurétiques, principalement ceux agissant sur l'axe rénine-angiotensine-aldostérone (VAN BORTEL

et al., 2001). Les nitrates, par leur effet de vasodilatation périphérique, diminueront l'onde de pouls réfléchie et donc la pression systolique et la pression pulsée (O'ROURKE, 1994).

La combinaison de traitement demeure très intéressante en ce qui a trait à moduler la rigidité artérielle et la pression pulsée avec succès. Le groupe d'ASMAR et al. (2001) a présenté les résultats d'une étude comparative d'un traitement avec l'aténolol ou bien avec une faible dose d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et un diurétique thiazidique (indapamide/périndopril). Bien que les deux groupes aient démontré une amélioration de la PWV et de la pression diastolique, seulement la combinaison diminuait l'onde de pouls réfléchie au niveau carotidien et diminuait donc de manière plus importante la pression systolique et la pression pulsée. Nous ne sommes toutefois pas en mesure de connaître le contenu en protéoglycans des artères de ces patients, qui rappelons-nous avait été augmenté avec un effet favorable sur la rigidité suite à un traitement avec l'indapamide (ET-TAOUIL et al., 2001). De plus, l'étude de ASMAR et al. (2001) ne divulgue pas les valeurs du bilan lipidique de ces patients avant et après le traitement. Dans notre laboratoire, le suivi du bilan lipidique des rats sous traitement avec une faible dose d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine associé à un diurétique thiazidique (indapamide/périndopril) a montré de manière étonnante des changements favorables en regard des lipides avec le traitement (RENAUD et al., sous presse).

Pour terminer, tel que proposé par VAN BORTEL et al. (2001) les développements futurs à prévoir seront probablement via des agents qui ne seront pas de la classe des anti-hypertenseurs, mais bien des médicaments qui modifieront la structure de la paroi artérielle, probablement le contenu en collagène ou la matrice interstitielle.

2.2. MODÈLE DÉVELOPPÉ

Cette section du chapitre traite du modèle que nous avons étudié afin de représenter la rigidité des grands troncs artériels. Notre première étape a été de construire une représentation mathématique sommaire de la rigidité artérielle pour un cylindre creux formé de plusieurs couches de matériel.

Il est à noter que de nombreux modèles sont présents dans la littérature. La grande majorité ont toutefois comme fonction de décrire les comportements de la paroi artérielle à l'occasion de simulation numérique du déplacement des artères. Ces derniers modèles ne sont pas conçus avec l'objectif d'étudier la rigidité des diverses couches, mais certains sont davantage d'intérêts pour nous (BERGEL, 1972) (CHANDRAN, 1992) (PHILLIPS, 1983) (SKALAK et CHIEN, 1987). Il est à noter que certains des modèles présentaient des informations qui pourront nous être utiles dans l'avenir concernant les propriétés des composantes de la paroi artérielle tel collagène et élastine (FUNG, 1981). Toutefois, la publication qui sera probablement la plus utile comme base à la conception d'un modèle impliquant les composantes des parois sera celle de

SILVER (1987). Ce dernier détaille de manière très précise les contributions à la rigidité de chacune des composantes de la paroi artérielle, y compris les protéoglycans.

Avant de poursuivre, il est nécessaire de préciser que nous nous sommes inspirés de plusieurs livres de mécanique des milieux continus afin d'effectuer les développements qui suivent (DUMONTET et al., 1994) (CHEVALIER, 1997) (ROYER et DIEULESAINT, 1996) (FLÜGGE, 1972).

2.2.1. L'équation de Navier

Nous débutons avec l'équation d'équilibre que nous traduisons par la suite en notation tensorielle :

$$\begin{aligned} \operatorname{div} \vec{\sigma} + \vec{f} &= \vec{0} \\ \sigma^{ij} |_{,j} + f^i &= 0 \end{aligned}$$

Maintenant, utilisons aussi la notation covariante et contravariante pour les lois du comportement. Nous avons donc pour les déformations et les contraintes :

$$\begin{aligned} \varepsilon^{ij} &= \frac{1}{2} \left(u^i |^j + u^j |^i \right) \\ \varepsilon_j^i &= \frac{1}{2} \left(u^i |_{,j} + u_j |^i \right) \end{aligned}$$

$$\varepsilon_i^i = \frac{1}{2}(u^i|_i + u_i|^i) = u^i|_i$$

$$\sigma^{ij} = 2\mu\varepsilon^{ij} + \lambda\varepsilon_m^m g^{ij}$$

Afin de déduire l'équation différentielle qui résout le système, nous posons initialement des forces extérieures nulles. Ainsi, nous remplaçons les expressions des déformations et des contraintes dans l'équation d'équilibre :

$$\mu u^i|_j + (\lambda + \mu)u^j|_j = 0$$

Cette dernière expression est l'équation de *Navier* que nous pouvons aussi écrire en notation vectorielle :

$$\mu \operatorname{div}(\operatorname{grad} \vec{u}) + (\mu + \lambda) \operatorname{grad}(\operatorname{div} \vec{u}) = \vec{0}$$

2.2.2. Application au problème d'un cylindre creux formé d'une couche de matériel

Avec l'objectif d'en arriver à représenter la paroi artérielle, nous débutons par décrire en coordonnées cylindriques le comportement des contraintes et des déformations d'un cylindre creux formé d'une couche de matériel. L'utilisation des coordonnées cylindriques a été facilitée par la consultation de SALENCON (1995).

Nous supposons que le champ de déplacements est de la forme suivante et ne varie que selon la direction radiale :

$$\vec{u} = u(r) \vec{e}_r$$

Nous supposons aussi que la paroi du cylindre est formée d'un matériel homogène isotrope répondant de manière linéaire. Les coefficients de *Lamé* du milieu sont μ et λ . Le rayon interne est R_1 et le rayon externe est R_2 et ces derniers sont beaucoup plus petits que la longueur de l'artère considérée. Des pressions radiales p_1 et p_2 sont appliquées de chaque côté de la paroi.

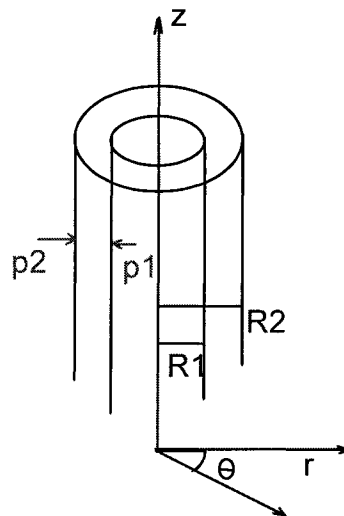


Figure 1 *Cylindre creux composé d'une couche de matériel en coordonnées cylindriques*

En utilisant les définitions du gradient et de la divergence en coordonnées cylindrique pour des champs vectoriels, nous obtenons l'expression suivante que nous simplifions par la suite :

$$2\mu \left(\frac{\partial^2 u}{\partial^2 r} + \frac{1}{r} \frac{\partial u}{\partial r} - \frac{u}{r^2} \right) + \lambda \left(\frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial u}{\partial r} + \frac{u}{r} \right) \right) = 0$$

$$(2\mu + \lambda) \left(\frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (ru) \right) \right) = 0$$

$$u(r) = \frac{Cr}{2} + \frac{D}{r} \Rightarrow \bar{u} = \left(\frac{Cr}{2} + \frac{D}{r} \right) \bar{e}_r$$

Nous inscrivons par la suite les expressions des déformations et des contraintes pour le champ de déplacement étudié :

$$\varepsilon^{ij} = \begin{bmatrix} \frac{\partial u}{\partial r} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{u}{r} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$\sigma^{ij} = \begin{bmatrix} \lambda \left(\frac{\partial u}{\partial r} + \frac{u}{r} \right) + 2\mu \left(\frac{\partial u}{\partial r} \right) & 0 & 0 \\ 0 & \lambda \left(\frac{\partial u}{\partial r} + \frac{u}{r} \right) + \frac{2\mu u}{r} & 0 \\ 0 & 0 & \lambda \left(\frac{\partial u}{\partial r} + \frac{u}{r} \right) \end{bmatrix}$$

Nous nous intéressons actuellement à l'expression des contraintes selon la direction radiale à l'intérieur de laquelle nous insérons la forme de l'équation du déplacement.

$$\sigma^{rr} = (\lambda + \mu)C - \frac{2\mu D}{r}$$

Nous utiliserons maintenant les conditions aux limites posées en début de problème afin de trouver les valeurs de C et D

$$\sigma^{rr}(R_1) = p_1$$

$$\sigma^{rr}(R_2) = -p_2$$

$$C = \frac{p_1 R_1^2 + p_2 R_2^2}{(\mu + \lambda)(R_1^2 - R_2^2)}$$

$$D = \frac{(p_1 + p_2)R_1^2 R_2^2}{2\mu(R_1^2 - R_2^2)}$$

2.2.3. Application au problème d'un cylindre creux formé de plus d'une couche de matériel

Pour l'analyse d'une paroi à plus d'une couche, nous procédons à partir des équations précédemment déduites. Nous donnerons en exemple le cas d'une paroi formée de 3 couches.

Les milieux sont supposés tous homogènes, isotropes et réagissants de manière linéaire. Les coefficients de *Lamé* pour la première, la deuxième et la troisième couche sont respectivement : λ_1 et μ_1 , λ_2 et μ_2 , et finalement λ_3 et μ_3 . Nous supposons qu'il n'y a pas de glissement permis entre les milieux lors des déplacements et que les vecteurs déplacements sont égaux aux intersections des milieux.

Aussi, nous considérons que les contraintes à la limite interne de la paroi doivent évaluer à la pression radiale interne imposée (p_1) et que les contraintes à la limite externe de la paroi doivent évaluer la pression radiale externe imposée (p_3). Les contraintes à l'interface entre les couches sont égales.

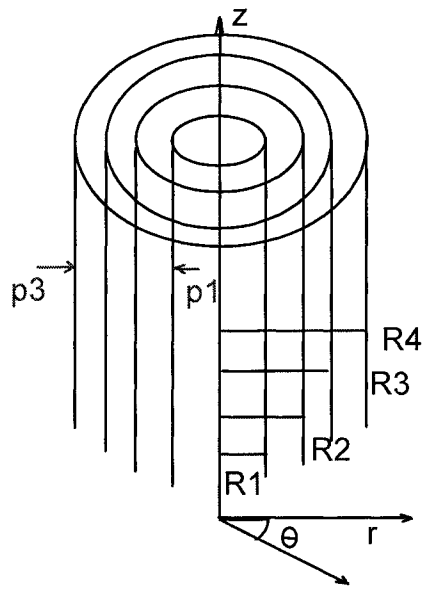


Figure 2 *Cylindre creux composé de plus d'une couche de matériel en coordonnées cylindriques*

En introduisant ces conditions, pour une paroi de trois couches, nous obtenons le système suivant de six équations avec six inconnus C_1 , D_1 , C_2 , D_2 , C_3 et D_3 qui représentent les constantes d'intégration :

$$(\lambda_1 + \mu_1)C_1 - \frac{2\mu_1 D_1}{R_1^2} = -p_1$$

$$(\lambda_1 + \mu_1)C_1 - \frac{2\mu_1 D_1}{R_2^2} = (\lambda_2 + \mu_2)C_2 - \frac{2\mu_2 D_2}{R_2^2}$$

$$\frac{R_2 C_2}{2} + \frac{D_2}{R_2} = \frac{R_2 C_1}{2} + \frac{D_1}{R_2}$$

$$(\lambda_2 + \mu_2)C_2 - \frac{2\mu_2 D_2}{R_3^2} = (\lambda_3 + \mu_3)C_3 - \frac{2\mu_3 D_3}{R_3^2}$$

$$\frac{R_3 C_2}{2} + \frac{D_2}{R_3} = \frac{R_3 C_3}{2} + \frac{D_3}{R_3}$$

$$(\lambda_3 + \mu_3)C_3 - \frac{2\mu_3 D_3}{R_4^2} = -p_3$$

Nous pouvons résoudre le système matriciel en inversant la matrice suivante et ainsi trouver les expressions de C_1 , D_1 , C_2 , D_2 , C_3 et D_3 avec le logiciel MatLab version 6.1.0.450 (MathWorks, Inc.).

$$\begin{bmatrix} (\lambda_1 + \mu_1) & \frac{-2\mu_1}{R_1^2} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ (\lambda_1 + \mu_1) & \frac{-2\mu_1}{R_2^2} & -(\lambda_2 + \mu_2) & \frac{2\mu_2}{R_2^2} & 0 & 0 \\ \frac{-R_2}{2} & \frac{-1}{R_2} & \frac{R_2}{2} & \frac{1}{R_2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & (\lambda_2 + \mu_2) & \frac{-2\mu_2}{R_3^2} & -(\lambda_3 + \mu_3) & \frac{2\mu_3}{R_3^2} \\ 0 & 0 & \frac{R_3}{2} & \frac{1}{R_3} & \frac{-R_3}{2} & \frac{-1}{R_3} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & (\lambda_3 + \mu_3) & \frac{-2\mu_3}{R_4^2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ D_1 \\ C_2 \\ D_2 \\ C_3 \\ D_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ -p_3 \end{bmatrix}$$

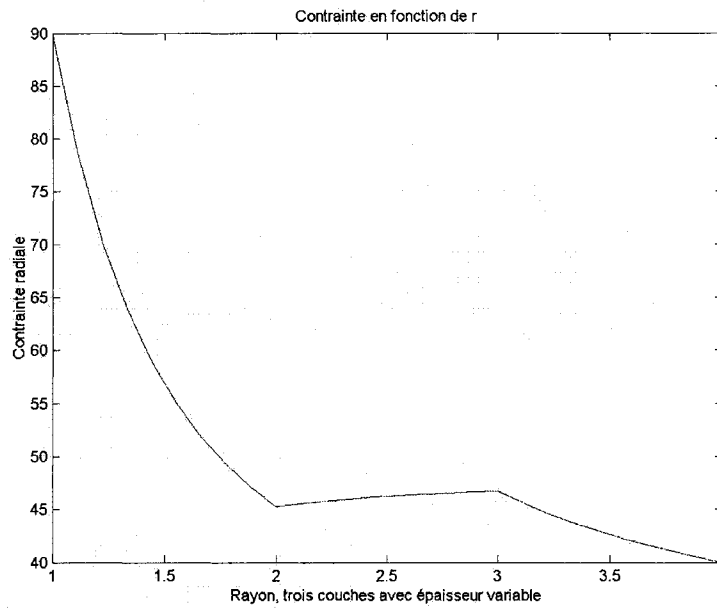


Figure 3 Simulation sur Matlab d'une analyse des contraintes en fonction du rayon

Cylindre creux formé de trois couches de matériel. Le rayon interne étant le début de la première couche de matériel et est égal à 1. La première couche est entre 1 et 2, la deuxième couche est entre 2 et 3 et la troisième couche est entre 3 et 4. Pour imager la situation, nous avons introduit des valeurs de contraintes aux limites internes et externes à des valeurs qui sont équivalentes à des pressions hypothétiques de pression, soit 90 à l'intérieur et 40 à l'extérieur du cylindre. Dans l'exemple présent, nous avons choisi de mettre des coefficients de lamé dans la deuxième couche de 100 fois supérieurs aux coefficients de lamé des deux autres couches du cylindre.

2.2.4. Inclusion du facteur temps

L'étape suivante de l'évolution du modèle consiste à inclure le temps. Nous nous sommes basés sur les démarches présentées dans NADEAU (1964), KREYSZIG (1993) et FLÜGGE (1972). Ainsi, nous débutons avec l'équation fondamentale de l'élastodynamique soit :

$$\mu u^i|_j + (\lambda + \mu) u^j|_i - \rho \ddot{u}^i = 0$$

Si nous développons cette dernière en coordonnées cylindriques selon la direction r et z, nous obtenons alors :

$$\rho \frac{\partial u_r^2}{\partial t^2} = (\lambda + \mu) \left(-\frac{u_r}{r^2} + \frac{\partial u_z^2}{\partial z \partial r} \right) + \mu \left(\frac{\partial u_r^2}{\partial z^2} - \frac{u_r}{r^2} \right)$$

$$\rho \frac{\partial u_z^2}{\partial t^2} = (\lambda + \mu) \left(\frac{1}{r} \frac{\partial u_r}{\partial z} \right) + (2\mu + \lambda) \left(\frac{\partial u_z^2}{\partial z^2} \right)$$

Ce développement n'est toutefois pas celui obtenu dans le cadre de deux modèles récents (QUARTERONI et al., 2000) (FORMAGGIA et al., 2001). En l'attente de trouver la discordance, nous ne nous sommes pas avancés à jumeler ces équations aux équations que nous avons obtenues pour le modèle d'un cylindre creux. Le résultat anticipé est d'obtenir une description des contraintes de l'artère en fonction du temps et de l'espace.

2.3. DISCUSSION

Nous avons un projet ambitieux et nous espérons que ce ne sera que partie remise lorsque nous serons en mesure de savoir la raison de nos discordances avec la littérature en ce qui a trait au développement de notre équation dans un contexte dynamique. À ce moment, il sera nécessaire de penser inclure dans le modèle une correction afin de tenir compte que les artères n'ont pas un comportement linéaire et qu'elles ont des propriétés viscoélastiques. Ces deux aspects avaient été négligés dans l'élaboration du modèle du cylindre creux.

Aussi, il est à préciser qu'il n'y a actuellement pas assez d'information dans la littérature afin d'être en mesure d'exprimer les coefficients de lamé de nos équations en fonction des divers éléments de la paroi artérielle. L'objectif étant par la suite de modifier ces éléments et de valider les effets pathologiques ou thérapeutiques que ces changements entraîneraient. À ce sujet, nous avons le choix de tenter de déterminer ces valeurs nous-mêmes, de tenter de faire les développements en effectuant des approximations avec les chaînons manquants ou bien d'attendre les développements de d'autres équipes sur le sujet.

Pour terminer ce chapitre, il est à préciser que les modèles de filtrations de macromolécules au travers des parois artérielles et les modèles de rigidité pourraient un

jour être fusionnés afin d'observer si des changements importants de rigidité sont induits en raison de la filtration de macromolécules dans la paroi.

**ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DES
PAROIS DES GRANDS TRONCS ARTÉRIELS**

3. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DES PAROIS DES GRANDS TRONCS ARTÉRIELS

3.1. PROBLÉMATIQUE

La plupart des modèles proposés afin d'expliquer la filtration d'albumine au travers des parois vasculaires utilisent des données en provenance de nombreuses expérimentations différentes chez plusieurs espèces. De plus, les informations utilisées dans l'élaboration des modèles proviennent dans la majorité des cas d'expérimentations qui ont été conçues afin de répondre à d'autres questions de recherche. Nous avons fait l'étude de l'aorte thoracique de lapin afin de tenter de valider ou d'améliorer un modèle mathématique de filtration de l'albumine au travers de cette artère. Ce modèle est actuellement véhiculé dans la littérature (KARNER et al., 2001) et a été bonifié par MANSEAU (2002).

Nous avons débuté notre étude des composantes de la paroi artérielle avec comme objectif premier d'obtenir des données géométriques concernant la structure de chacune des couches des parois artérielles. Toutefois, pour ce qui est de certaines structures, nous avons tenté d'approfondir davantage le sujet et de déterminer des avenues de recherche pour l'avenir.

3.2. ÉTUDE DE LA COUCHE DE SURFACE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES (CSCE)

La présence d'une couche de surface recouvrant les cellules endothéliales est connue depuis près de 40 ans et de nombreuses publications ont été dédiées à l'étude de cette structure. Cette dernière porte le nom de CSCE et est formée majoritairement de protéoglycans. Dans cette couche se trouve aussi certaines molécules d'adhésion et composantes du système de coagulation et de fibrinolyse. La couche de protéoglycans directement reliée à la membrane porte le nom de glycocalyx (PRIES et al., 2000). Plusieurs méthodes directes et indirectes ont été développées afin de mettre en évidence la présence tout comme les propriétés de cette CSCE. Nous présenterons les données les plus pertinentes pour nous ainsi que les avenues possibles afin de poursuivre les recherches suite à nos résultats mitigés en ce qui a trait à l'étude de cette couche formée majoritairement de protéoglycans.

3.2.1. Quelques mots sur les protéoglycans

De nombreuses fonctions sont reconnues aux protéoglycans au sein du corps humain, notamment celui d'assurer la protection ou le maintien de certains épithéliums et structures. Par exemple, nous retrouvons des protéoglycans au sein des os et des cartilages (KALUNIAN, et al., 2003) et ces derniers auraient un rôle important en ce qui a trait aux développements embryogéniques de ces derniers (MELROSE et al. 2003). Entre autre, nous retrouvons aussi des protéoglycans au sein des interstices, du liquide

synovial, de la cornée, de la peau (KING, 2003) tout comme sur la surface de nombreuses cellules telle l'endothélium des parois vasculaires.

Nous savons que les protéoglycans se retrouvent à la surface des cellules endothéliales sous plusieurs formes, mais que l'héparan sulfate est le type le plus retrouvé à cet endroit, soit 50 à 90 % des protéoglycans de la couche de surface (IHRCKE et al., 1993). Cette dernière forme de protéoglycan est sécrétée par les cellules endothéliales et sa structure précise est dépendante du tissu d'où la molécule origine (DIETRICH et al., 1983). Dans le cas des cellules endothéliales, la structure de l'héparan sulfate est formée d'une protéine centrale à laquelle sont attachés des unités de glucosamine et d'une forme d'acide uronique comme l'acide glucuronique et l'acide iduronique (DIETRICH et al., 1998). Ces unités, attachés à la protéine centrale par des liens O-glycosidiques, sont très longues et peuvent atteindre des longueurs jusqu'à 80 nm (KING, 2003). Les expérimentations de HALDENBY et al. (1994) montrent que les groupes carboxyls représentent la majeure partie de la charge électrique présente au niveau des protéoglycans du glycocalyx. Les groupes sulfatés seraient aussi présents mais dans une proportion moindre. De plus, il a été démontré que nous pouvons séparer l'héparan sulfate présente sur les cellules endothéliales en deux types. Soit celui qui peut être dissocié de la membrane des cellules endothéliale avec un traitement d'héparine et un autre type qui ne peut être dissocié des cellules endothéliales avec le même traitement (LOWE-KRENTZ et al. 1992). L'hypothèse avancée serait que le type d'héparan sulfate qui peut être relâché avec un traitement à l'héparine ne soit que faiblement lié à la

membrane tandis que le deuxième type serait davantage attaché via une protéine d'encrage. Ce dernier type serait apparenté davantage à l'héparan sulfate retrouvé dans la matrice extracellulaire, soit probablement le glypican.

Certaines modulations possibles de la synthèse de l'héparan sulfate sont connues. Nous pouvons penser ici à l'augmentation de la production de l'héparan sulfate par les cellules endothéliales et aux changements de sulfatation de l'héparan sulfate et de composition de l'acide uronique qui sont retrouvés suite à l'exposition des cellules endothéliales de lapin à l'héparine et à certains composés comme le GL-522-Y-1 (PINHAL et al., 2001). Ces deux dernières molécules agiraient le plus probablement sur le même récepteur. Les auteurs de l'étude émettent l'hypothèse qu'une partie de l'effet anticoagulant de l'héparine pourrait être due à la synthèse augmentée d'héparan sulfate en plus de l'effet sur l'antithrombine III.

3.2.2. La couche de surface des cellules endothéliales (CSCE) comme étant une barrière à la filtration des macromolécules

Nous avons certaines données qui nous permettent de croire qu'une grande partie des propriétés de l'endothélium, en ce qui a trait à la filtration des macromolécules, sont dues à la présence de la CSCE. Premièrement, nous nous basons sur les conclusions de TARBELL et al. (1988) qui ont obtenu une chute de vitesse de filtration qu'ils attribuaient à la présence d'albumine au sein du glycocalyx. Cet effet barrière attribuée aux protéines présentes dans la CSCE a aussi été démontré par BALDWIN et

WINLOVE (1984) lors d'une comparaison de pénétration du Ruthénium red suite à une perfusion avec du salin ou bien du sérum. La chute de la vitesse de filtration observée par l'équipe de TARBELL et al. (1988) était d'une valeur très semblable à celle observée par TEDGUI et LEVER (1984) lorsque ces derniers retiraient l'endothélium couvrant les aortes de lapins. De plus, les résultats de MASON et al. (1977) vont dans le sens qu'une proportion importante de la baisse de la vitesse de filtration au niveau des capillaires de grenouilles peut être expliquée par la CSCE. La quantification de ce phénomène a été faite par ADAMSON (1990) qui a démontré que suite à un traitement à la pronase, il observait une diminution de 60 % de la résistance hydraulique des parois capillaires de grenouille. Il attribuait cette différence à la présence de la CSCE. Ces expériences sont en accord avec celles du groupe de HU et al. (2000) qui ont d'ailleurs émis l'hypothèse du rôle du glycocalyx comme barrière à la filtration sous forme d'un modèle mathématique avant leur expérimentation animale (HU et WEINBAUM, 1999).

Aussi, la présence d'une couche de surface de l'endothélium avec des propriétés barrières a été démontrée de manière indirecte en montrant qu'il y avait une zone d'exclusion au niveau de la surface des cellules endothéliales. L'observation d'une zone d'exclusion pour une couche formée de protéoglycans concorde avec le fait que nous retrouvons aussi une zone d'exclusion protéique dans les milieux interstitiels qui sont eux aussi formés en partie importante par des protéoglycans (AUKLAND et REED, 1993). Nous reviendrons sur ce sujet plus en détail en discutant de l'épaisseur supposé de la couche de surface et du glycocalyx des cellules endothéliales.

3.2.2.1. Modèles mathématiques de la couche de surface des cellules endothéliales (CSCE)

Afin de construire un modèle valable du comportement de l'albumine et de sa relation avec la CSCE, nous avons préalablement besoin de certaines informations importantes. Ces dernières sont relatives au comportement biologique, chimique et physique de la couche de surface en plus des interactions des particules et liquides avec la couche de surface. Tel que décrit précédemment, certaines méthodes existent afin de mesurer la résistance hydraulique de la CSCE (ADAMSON, 1990). De plus, nous avons de nombreuses informations quant à la structure du réseau de protéoglycans de la CSCE ainsi qu'en rapport à l'arrangement et la quantité des charges négatives des glycosaminoglycans. Par exemple, l'étude structurale effectuée par SQIRE et al. (2001) à partir de photographies en microscopie électronique suggère que le glycocalyx est formé d'un réseau de fibres de 10-12 nm avec des espacements entre les fibres de 20 nm. Ces réseaux fibreux constituent des « grappes » qui se présentent de manière régulière à tous les 100 nm. Ajoutons à cela que nous disposons des données relatives au comportement mécanique des protéoglycans. Ces dernières sont inférées du fait que les globules blancs, qui sont peu déformables, occupent la place entière de la lumière lors de leur passage et compriment le glycocalyx lors de leur passage (VINK et DULING, 1996). Ces derniers ont aussi démontré que les globules rouges occupent une partie de la CSCE lors de situations statiques et qu'ils en sont exclus pendant un flot. De cela, nous sommes en mesure de déduire la force radiale maximale exercée par la couche de surface sur un globule rouge au repos. Afin de construire les modèles

mathématiques actuels de la CSCE, il était nécessaire d'ajouter aux données déjà exposées, certains aspects récemment décrits en relation avec l'influence de la charge et de la taille des molécules sur le transport des molécules chargées au travers de la couche de surface des cellules endothéliales (VINK et DULING, 2000). La modélisation de ces données a résulté en trois modèles mathématiques récents et intéressants, les deux premiers décrivent le transport des molécules chargées au travers de la CSCE (BINGMEI et al., (2001) (STACE et DAMIANO, 2001) et le troisième modèle a été inspiré du deuxième en ajoutant les composantes reliées aux forces et contraintes (DAMIANO et STACE, 2002).

3.2.3. La couche de surface des cellules endothéliales (CSCE) en lien avec diverses pathologies

3.2.3.1. Athérosclérose

Tel que nous l'avons présenté au chapitre précédent, l'importance de la CSCE comme barrière de la filtration est bien reconnue et sa destruction pourrait mener à une augmentation de la perméabilité des troncs artériels, qui est observée dans plusieurs états pathologiques, tels que l'athérosclérose, et pourrait mener à un œdème du tissu cardiaque. Effectivement, il a été montré que la destruction de la couche de surface à l'aide d'hyaluronidase mène à un œdème du tissu cardiaque (VAN DER BERG, 2003). Cette observation concorde avec le fait que la digestion enzymatique des protéoglycans des coronaires porcines réduit la résistance à l'entrée des protéines dans la paroi

artérielle (HUXLEY et WILLIAMS, 2000). Comme autre preuve de l'implication fort probable la CSCE dans la pathogénèse de l'athérosclérose, un groupe a récemment publié deux articles qui démontrent que la CSCE est détruite par l'action des lipoprotéines de faible densité oxydées et que cette destruction est prévenue par la superoxide dismutase (SOD) et/ou la catalase (CONSTANTINESCU et al., 2001) (VINK et al., 2000). Allant dans le même sens, BERSEWICZ et al. (1998) ont démontré que post-ischémie, la vasodilatation des coronaires de cochons d'Inde est abolie si la CSCE est détruite et que cette destruction et cette perte de vasodilatation peuvent être prévenues par l'administration de SOD. Dans le même sens, le groupe de MOCHIZUKI et al. (2003) a démontré qu'un traitement à la hyaluronidase diminuait la production de NO, une substance vasodilatatrice, en réponse à un flot dans les artères fémorales de chiens.

Des avenues de traitements chez l'humain sont même actuellement en essai principalement en Italie. De petites études non randomisées et comprenant peu de patients ont démontré que les patients traités avec un protéoglycan per os (Mesoglycan) avaient peu de récurrence d'accident cérébro-vasculaire (BETTINI et al., 2003) et une moindre progression de l'épaississement de l'intima et de la média au niveau des artères carotides et fémorales (LEURORA et al., 1998). Ces observations vont dans le sens des connaissances que nous avons en ce qui a trait aux interactions que l'héparan sulfate entretient avec l'antithrombine III (MERTENS et al. 1992) qui pourraient avoir certaines répercussions sous forme d'effets anticoagulants. De plus, l'héparan sulfate est

nécessaire dans la transcytose de la lipoprotéine lipase et joue donc un rôle dans la régulation du métabolisme des lipides (OBUNIKE et al., 2001).

Toutefois, il faut préciser que l'effet de l'administration exogène de protéoglycans pourrait avoir un effet sur la formation de la néointima en plus d'un effet possible sur la CSCE. Effectivement, le groupe de CHAJARA et al. (1996) a observé que la formation de néointima et la prolifération des cellules musculaires lisses étaient en corrélation avec le niveau d'hyaluronan. Toutefois, les niveaux d'hyaluronan continuaient à augmenter malgré la régression de la néointima. Cette information mise en lien avec le fait que de hautes concentrations d'hyaluronan inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses (BINGLEY et al. 1998) ont permis de formuler l'hypothèse que l'hyaluronan pourrait être impliquée dans la régression de la néointima. De plus, il a été démontré que l'héparan sulfate était aussi impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses, mais que ce dernier n'était pas suffisant seul (ETTENSON et al., 2000). Finalement, il faut préciser qu'il n'y a actuellement pas d'expérimentation publiée tentant un traitement de protéoglycans in vivo sur des animaux à risque de développer une maladie athérosclérotique et suivant l'évolution de la maladie athérosclérotique sous ce traitement. Ce serait une avenue intéressante pour l'avenir.

Pour terminer cette section, il est nécessaire de préciser que nous avons aussi certaines évidences que les protéoglycans pourraient avoir des rôles délétères en ce qui a trait à la progression de l'athérosclérose et que les débats à ce sujet ne sont pas clos. Nous

pouvons premièrement citer qu'un lien est établi entre le fait que les vaisseaux susceptibles à l'athérosclérose montrent une augmentation de TGF- β principalement au niveau de l'espace sous-endothélial (SCOTT et al., (1997)) accompagnée d'une augmentation de la présence des protéoglycans. La synthèse de ces derniers est probablement entraînée par le TGF- β (KAJI et al. 2000). Encore ici, il faut préciser que la présence de ces protéoglycans pourrait aussi avoir un rôle protecteur. Toutefois, en plus d'un rôle probablement bénéfique décrit précédemment en rapport aux effets décrits sur la croissance des cellules musculaires lisses, les protéoglycans jouent aussi un rôle néfaste en favorisant probablement la formation des agrégations de LDL dans l'intima (PENTIKAINEN et al., 1997) que nous savons liés à des éléments de la matrice extracellulaire (NIEVELSTEIN, 1991). Cela, principalement au niveau des bifurcations (SCHWENKE, 2000). De plus, des observation récentes montrent que la régression tardive de la néointima à l'intérieur de tuteurs vasculaires dans des coronaires de porcs est reliée à une diminution du contenu en protéoglycans de l'intima (KIM et al., 2000).

3.2.3.2. *Sepsis*

La CSCE pourrait aussi être incriminée dans l'augmentation de la perméabilité reliée aux états septiques. Supportant cette hypothèse, nous savons que l'IL-1 et le TNF- α retrouvées dans des états septiques stimulent la synthèse des protéoglycans (IHRCKE et al., 1993). Toutefois, la CSCE est partiellement détruite lorsque mise en contact avec le TNF- α (HENRY et DULING, 2000) ou bien le PAF (SILVESTO et al., 1994). Ce paradoxe peut être expliqué du fait que des protéases provenant des neutrophiles clivent

les protéoglycans attachés à l'endothélium (KEY et al., 1992) et que ces derniers se retrouvent dans la circulation en plus grand nombre. De plus, les stress oxydatifs (CONSTANTINESCU et al., 2001) et l'ischémie-reperfusion (BERESEWICZ et al., 1998) entraînent une destruction la CSCE qui peut être prévenue par la superoxide dismutase. Toutefois, bien qu'il est maintenant accepté que le stress oxydatif est présent lors des états septiques (ZHANG et al., 2000), nous ignorons si ce dernier entraîne des défauts directs au niveau la CSCE en sepsis. Aussi, nous ne savons pas si le fait d'agir sur les protéoglycans a un impact clinique lors des états septiques.

3.2.4. Épaisseur la couche de surface des cellules endothéliales (CSCE)

L'épaisseur du glycocalyx mesuré varie d'un site à l'autre et selon les méthodes de fixation utilisées. Les meilleures approximations sont celles utilisant les perfusions à base de fluorocarbones et les meilleures images que nous avons du glycocalyx sont au niveau de la microcirculation et montrent une épaisseur de 60 à 110 nm. En ce qui a trait aux artères, le glycocalyx serait de 250 à 300 nm (SIMS et HORNE, 1994). Ces mesures sont plus grandes que celles faites à partir du bleu d'alcan où la mesure d'épaisseur varierait entre 45 nm pour les coronaires et 81 nm pour les carotides de lapins (HALDENBY et al., 1994). Ces mesures sont toutefois dépendantes d'une fixation adéquate et il est loin d'être certain que la récupération de l'ensemble de la CSCE soit complète. Certaines expériences ont aussi utilisé des lectines marquées avec des haptens fluorescents afin d'étudier le glycocalyx (HALDENBY et al. 1994). Les lectines se lient à certaines composantes des protéoglycans de manière spécifique, mais cette technique

est peu utile afin de déterminer de manière précise l'épaisseur du glycocalyx et de la CSCE. De plus, nous disposons de nombreuses évidences qui suggèrent que la CSCE est beaucoup plus épaisse que le laissent entrevoir les colorations des molécules de la couche qui ne sont pas éliminées avec les lavages successifs.

Une manière indirecte de démontrer la présence d'une couche de surface est de prouver la présence d'une zone d'exclusion à la surface des cellules endothéliales. Ces méthodes nous permettent de déterminer de manière plus précise l'épaisseur de l'ensemble de la CSCE et non seulement les molécules plus fortement liées. Une démonstration de l'espace d'exclusion à la surface des capillaires des glomérules de rats a été faite par HJALMARSSON et al. (2004) en ce qui a trait à l'exclusion de particules lipidiques pour une couche de 200-nm. Pour ce qui est des artérioles, VAN HAAREN et al. (2003) ont observé en microscopie confocale le flot de diverses grosseurs de dextran lié au FITC dans les artérioles mésentériques de rats. Ces derniers ont observé une région d'exclusion de $2,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ à la surface de l'endothélium pour ce qui a trait aux grosses molécules de dextran (148 kDa). Cette zone d'exclusion n'était pas présente pour les petites molécules de dextran (4,4 kDa) et la zone d'exclusion disparaissait pour toutes les sortes de molécules suite au traitement de l'endothélium par un stress phototoxique. Une étude légèrement antérieure avait d'ailleurs démontré que le traitement avec de l'hyaluronidase entraînait une augmentation de la pénétration sans toutefois que la CSCE ait changé d'épaisseur (HENRY et DULING, 1999). Les auteurs

concluait que l'hyaluronan avait probablement un rôle précis en ce qui a trait à la perméabilité de la CSCE.

Une dernière méthode est disponible et utilise la présence d'une zone d'exclusion dans les capillaires en évaluant le changement de l'hématocrite des tubes capillaires suite à un traitement du réseau capillaire étudié avec des enzymes (DESJARDINS et DULING, 1990). Ce groupe suggère, qu'en se fiant sur la méthode du changement de l'hématocrite des tubes capillaires, l'épaisseur de la couche de surface des cellules endothéliales au niveau des capillaires devrait être environ 1,2 μm . Il est entendu que cette méthode ne peut être appliquée en ce qui a trait aux artères puisque la technique utilisant le changement d'hématocrite des tubes capillaires n'y serait pas fiable.

3.2.5. Protocole de coloration des protéoglycans au Ruthénium red

Nous avons utilisé un protocole de coloration et de fixation avec le Ruthénium red inspiré des expériences présentées par RICHARDSON et al. (1988) et par LUFT (1966). Le Ruthénium Red est un colorant chargé négativement qui se lie de manière préférentielle aux protéoglycans chargés négativement. Nous aborderons dans la discussion les faiblesses de la méthode et d'autres possibilités s'offrant à nous pour l'étude et la validation de la présence la CSCE.

3.2.5.1. Protocole de coloration au Ruthénium red utilisé dans le présent protocole

Nous avons utilisé les aortes en provenance des expérimentations de filtration qui sont présentées dans le chapitre précédent. Ces expériences ont été pratiquées chez des lapins mâles albinos New Zealand de 2,7 à 2,9 kg.

Immédiatement à la fin du protocole de filtration présenté au chapitre 4, lorsque l'aorte thoracique baignait dans une solution physiologique oxygénée de Krebs maintenue à 37 °C, nous avons remplacé la solution de Krebs avec BSA-FITC qui baignait l'intérieur de l'aorte pour une solution constituée de Glutaraldéhyde 0,5 % *p*-parafolmaldéhydes 2,5 % (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.) dans 0,1 M de PBS à pH 7,4. Après 10 minutes de fixation avec une pression interne de 50 mmHg, nous avons retiré l'aorte du bain pour la diviser en segments pour les analyses. Dans le cas d'un des anneaux de l'aorte thoracique, la fixation dans le fixateur a été poursuivie pour 24 heures avant que les échantillons soient rincés deux fois avec une solution de PBS 0,1 M. L'anneau a ensuite été placé dans une solution de Ruthénium red à 0,75 mg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans le sodium de cacodylate 0,1 M pour 16 heures. L'échantillon a ensuite été rincé deux fois avec du sodium de cacodylate pour être refixé avec du tetroxide d'osmium 1 % avec Ruthénium red à 0,75 mg/ml pour 2 heures. L'échantillon a finalement été rincé deux fois avec du sodium de cacodylate pour subir une coloration avec 10 % d'acétate d'uranyl (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.) pour 60 minutes. Les échantillons ont alors été déshydratés par des

incubations successives dans des concentrations graduelles d'alcool de 50 % à 100 % pour ensuite être mis dans l'EPON et être polymériser pendant 48 heures. Des couches minces ont été faites et placés sur des grilles de cuivre pour observation subséquente en Microscope électronique HITACHI H7500 et les images ont été numérisées à l'aide d'une caméra numérique KODAK MEGAPLUS Camera Model 1,6 pour être ensuite traitées avec le logiciel A.M.T. V 2.25.5.

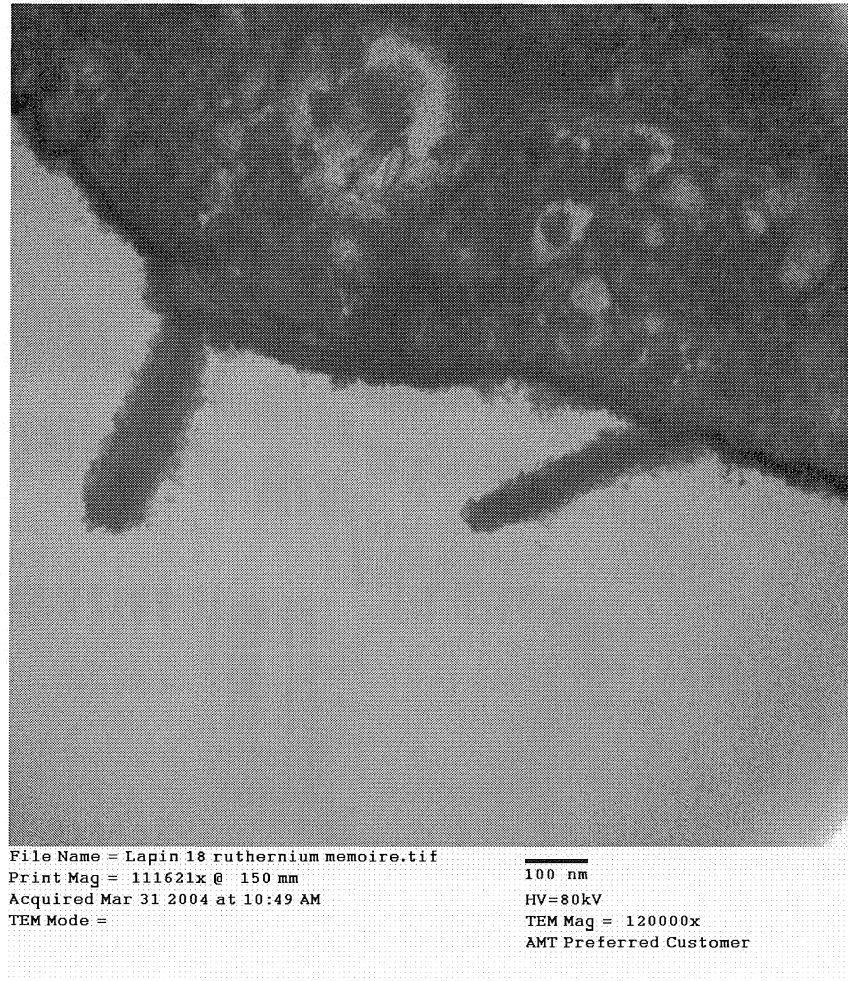


Figure 4 *Surface de l'endothélium de l'aorte thoracique de lapin*
Aorte fixée in vitro à une pression interne de 50 mmHg.
Coloration par la suite avec du Ruthénium red.

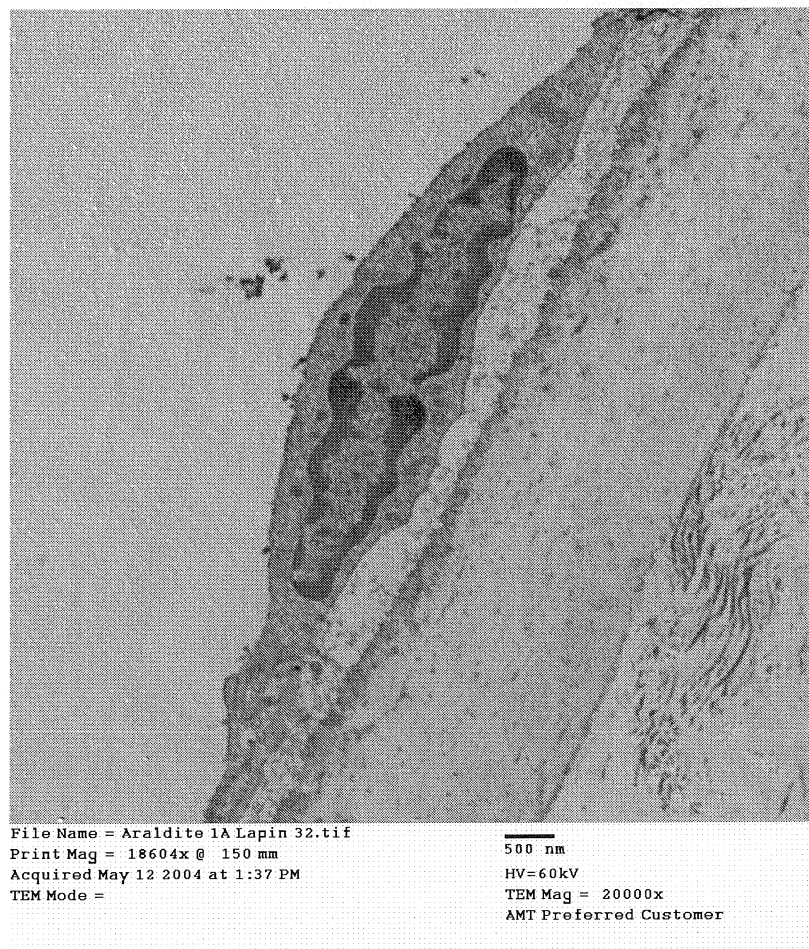


Figure 5 *Surface de l'endothélium de l'aorte thoracique de lapin*
 Coloration alternative avec le bleu d'alcan. Aorte fixée in vitro à une pression interne statique de 50 mmHg pendant une heure avec une solution d'aldéhydes contenant 0,2 % de bleu d'alcan, 0,04 M de $MgCl_2$ à pH 5,75. Préparation usuelle par la suite pour observation en microscopie électronique à transmission. Il est possible de remarquer les excroissances au-dessus des cellules endothéliales qui pourraient correspondre à des protéoglycans.

3.2.5.2. Contrôle avec la coloration au Ruthénium red d'un réseau de fibrine contenant de l'acide hyaluronique

Nous étions intéressés à valider la coloration des protéoglycans par le Ruthénium red tel que décrit dans la littérature. Nous avons utilisé des réseaux de fibrine fabriqués au département de génie chimique de l'Université de Sherbrooke par M. Yves Martin et à l'intérieur desquels différentes concentrations d'acide hyaluronique avaient été ajoutés. Ces protocoles sont inspirés de HAYEN et al. (1999).

Tous les réactifs utilisés doivent être à 37 °C. La première étape consiste à produire la solution suivante : CaCl₂ 5 mM, Fibrinogène humain de type I 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) et Acide hyaluronique avec des concentrations entre 0 et 1,2 mg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans PBS 0,1 M pH 7,4. Ce mélange a été complété en ajoutant de la thrombine humaine conservée dans du citrate de sodium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) pour obtenir une concentration finale de thrombine de 1 U/ml. À partir de ce moment, il était nécessaire d'incorporer rapidement ce mélange à un moule et de laisser réagir à la température de la pièce pendant 3 heures. Les échantillons ont ensuite été placés dans une solution de Glutaraldéhyde 2 % *p*-paraformaldéhydes 1 % dans 0,1 M de sodium cacodylate à pH 7,4 pour 24 heures. Les réseaux de fibrine ont ensuite été soumis aux mêmes protocoles de coloration que les échantillons d'aorte. Toutefois, certains réseaux de fibrine ont été exposés à un protocole identique en omettant le Ruthénium red.

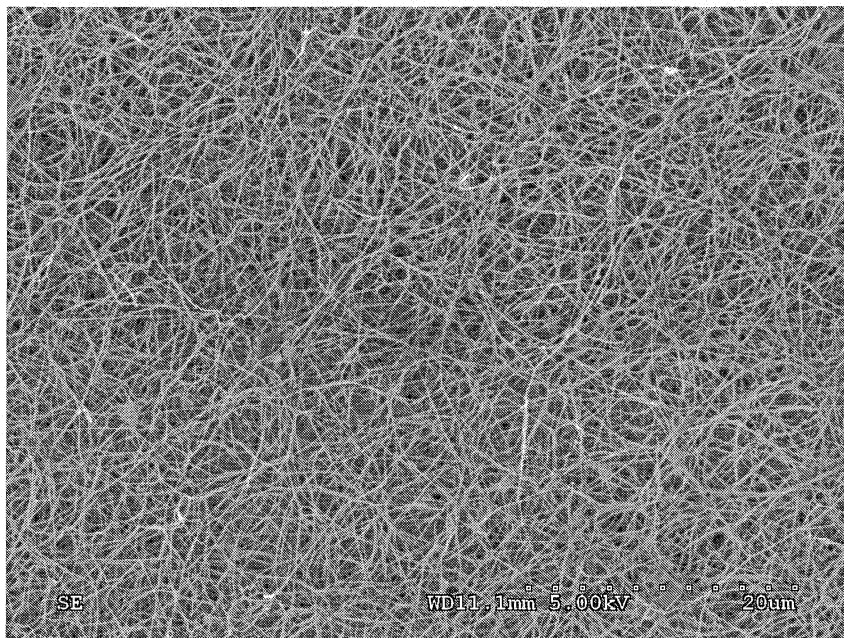


Figure 6 *Réseau de fibrine avec acide hyaluronique*
Microscopie à balayage à pression variable.

(Autorisation de M. Yves Martin.)

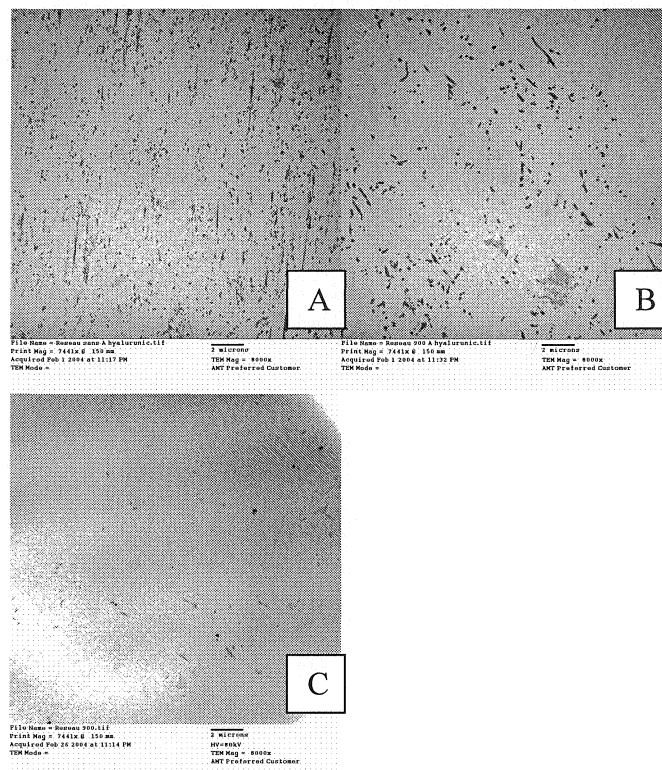


Figure 7 Coloration au Ruthénium red du réseau de fibrine
 Microscopie à transmission d'un réseau de fibrine. A) Réseau de fibrine sans acide hyaluronique mais avec coloration au Ruthénium red. B) Réseau de fibrine avec ajout d'une solution de 900 µg/l d'acide hyaluronique et coloration au Ruthénium red. C) Réseau de fibrine avec ajout d'une solution de 900 µg/l d'acide hyaluronique sans coloration au Ruthénium red.

3.2.6. Discussion

3.2.6.1. Critique de l'expérimentation actuelle

Sans coloration spéciale, les chances d'identifier la CSCE sont minces. De plus, tel que nous l'avons déjà expliqué, la méthode que nous avons initialement utilisée est probablement mauvaise en ce qui a trait à la préservation de l'architecture du tissu. Effectivement, le Ruthénium Red est une molécule assez grosse qui peut ne pas avoir diffusé de manière correcte en plus de distordre la structure formée de protéoglycans (SCOTT et HUGHES, 1983). Néanmoins, nous avons été en mesure d'identifier une partie de la couche des cellules endothéliales de l'aorte, probablement les protéoglycans liés à la membrane endothéliale de manière importante. Toutefois, nous ne pouvons décrire la géométrie ou quantifier l'épaisseur exacte de la CSCE.

En ce qui a trait à la coloration des réseaux de fibrine avec diverses colorations d'acide hyaluronique, nous pouvons conclure que le Ruthénium red effectue la coloration de l'acide hyaluronique. Toutefois, le Ruthénium red marque aussi les caillots de fibrine et se révèle donc une coloration qui n'est pas spécifique uniquement aux protéoglycans.

Suite aux expériences de LUFT (1966) qui a démontré avec une coloration au Ruthénium red la présence d'une couche de surface de l'endothélium au niveau capillaire, de nombreuses tentatives ont été faites afin de colorer la couche de surface de

l'endothélium. Le développements de plusieurs techniques s'en est suivi, que ce soit avec du bleu d'alcian (HALDENBY et al., 1994), des perfusions contenant des fluorocarbones (SIMS et HORNE, 1994) ou du bleu de cupromeronic tel qu'utilisé par HJALMARSSON et al. (2004) pour les capillaires rénaux. Toutefois, aucune de ces méthodes de coloration n'obtenait un résultat optimal démontré sur les artères (PRIES et al., 2000) et certaines nécessitaient plusieurs lavages. Tous ces lavages étaient incompatibles avec les expériences de filtration que nous effectuons. C'est la raison pour laquelle nous avons tenté le Ruthénium initialement malgré les faibles chances de réussite.

Il reste que la méthode la plus intéressante qu'il nous reste afin de fixer la CSCE est la méthode employant du tetroxide d'osmium 1 % dissous dans une perfusion de fluorocarbones (FC-72) (SIMS et HORNE, 1994). Cette perfusion est semblable à la méthode utilisée afin de fixer le mucus (SIMS et HORNE, 1994) et à une méthode semblable a aussi été utilisée par ROSTGAARD et QVORTROP (1996). Ces derniers ont toutefois utilisé une perfusion légèrement différente de fluorocarbones qui était en mesure de se substituer au sang et d'assurer le transport d'oxygène in vivo.

3.2.6.2. Localisation par immunocytochimie des protéoglycans

À l'occasion de nos expériences de filtration, il serait intéressant et pertinent d'être en mesure de localiser les protéoglycans et de vérifier si l'albumine nouvellement filtrée est liée à ces derniers. Ainsi, nous pourrions effectuer des expériences en

immunocytochimie qui nous permettraient de localiser certains des protéoglycans sur la surface des cellules endothéliales.

La première étape consisterait à fixer *in vitro* le glycocalyx à la fin des expériences de filtration décrites dans le chapitre 4. Le protocole à tenter en premier afin de fixer le glycocalyx serait celui utilisant les fluorocarbones. Nous n'avons toutefois aucune donnée en ce qui a trait à la destruction des sites antigéniques du FITC et des protéoglycans par des fixations à l'aide de fluorocarbones. Il faudrait donc faire quelques essais avant de choisir de manière définitive cette méthode de fixation pour les protéoglycans. Si les sites antigéniques sont détruits avec l'exposition aux fluorocarbures, nous devons utiliser une solution de bleu d'alcan 0,2 % ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans une solution de Glutaraldéhyde 1,5 % *p*-parafolmaldéhydes 2,5 % dans $MgCl_2$ 0,04 M dans 0,1 M de PBS à pH 7,4 pour 2 heures. La méthode avec le bleu d'alcan est inspirée de FORTIER et HOULD (2003).

Ainsi, avenant que les fluorocarbones ne détruisent pas les sites antigéniques, à la fin du protocole de filtration du FITC, l'aorte serait emplie de manière statique pendant 10 minutes à une pression de 50 mmHg avec une solution non-acqueuse contenant 1% de tetroxide d'osmium dissout dans un fluorocarbone (FC-72, chez 3M Canada, London, ON). L'aorte serait alors lavée brièvement avec une solution de FC-72 pure avant de faire une nouvelle fixation avec un mélange d'aldéhydes pour un total de 120 minutes à

température de la pièce. Les coupes seraient alors montées dans l'EPON pour visualisation en microscopie électronique.

À noter que nous pourrions envisager de faire les expériences décrites ci-après sur la même grille utilisée en microscopie électronique pour les localisations de FITC-BSA en effectuant la localisation des protéoglycans sur l'autre côté de la grille. Le protocole des expérimentations de localisation ci-après est inspiré des expérimentations en immunocytochimie faites sur les cartilages (MELROSE et al. 2003) (SHARAWY et al. 2003).

Ainsi, une fois le tissu fixé et les grilles préparées, nous devons procéder à une digestion nécessaire des protéoglycans afin de découvrir les sites antigéniques. Cette digestion pourrait se faire à l'aide de produits que nous avons déjà, soit une incubation de 4 heures à température de la pièce avec de la Chondroitinase ABC à 0,1 U/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne). Nous avons le choix de rechercher de nombreux types de protéoglycans. Le choix qui est fait de tenter de localiser l'héparan sulfate relève du fait que la protéine est fortement retrouvée à la surface des cellules endothéliales et que des anticorps sont commercialement disponibles contre ces molécules. Effectivement, certains protéoglycans tels que l'hyaluronan n'ont pas de site antigénique bien définis et doivent être retrouvés indirectement via la localisation d'autres protéines (LEVESQUE et al. 1994). Nous pourrions donc à ce moment utiliser un des anticorps disponibles commercialement et dirigé contre l'héparan sulfate. Les

anticorps qui semblent les plus intéressants pour l'application que nous voulons en faire sont des IgM faits chez la souris (Seikagaku, MA, É.-U.) et qui ont déjà été démontrés efficaces dans un autre type d'expérience chez les lapins (BUCKLEY et al., 1996). Les anticorps de trois autres compagnies sont aussi disponibles mais ces derniers n'ont pas été testés chez les lapins (Chemicon, Temecula, CA) (Upstate biotechnology, Lake Placid, NY) (Europa bioproduct). Il resterait à incuber les grilles sur une solution de protéine A-or ou de protéine G-or avant d'effectuer la coloration des grilles et de visualiser le tout en microscopie électronique à transmission.

3.3. ÉTUDE DE L'ENDOTHÉLIUM

3.3.1. La contribution de l'endothélium à la perméabilité

3.3.1.1. Le passage transcellulaire via des vésicules et le transport vis les jonctions

Le transport des particules au travers des cellules endothéliales et épithéliales est le sujet de nombreuses recherches depuis de nombreuses années. Les résultats présentés ici sont le fruit de travaux dans de nombreux domaines reliés aux sciences fondamentales biologiques (SIMIONESCU et al., 2002). De nombreuses revues sont actuellement écrites sur le sujet (BENDAYAN et al., 2002) (SIMIONESCU et al., 2002), mais il est possible de résumer en quelques paragraphes les éléments qui nous sont pertinents dans le développement des modèles de filtration.

Le modèle actuellement le plus accepté est celui de deux systèmes de transport distinctifs, soit celui d'un système de transport intracellulaire via un système vésiculo-tubulaire et un autre système empruntant les jonctions intercellulaires (BENDAYAN, 2002). Les jonctions intercellulaires seraient responsables principalement du transport des petites molécules (RENKIN, 1985) et le système vésiculo-tubulaire serait responsable du transport des macromolécules (SIMIONESCU et al., 2002), dont l'albumine (GHITESCU et BENDAYAN, 1992).

Les vésicules sont d'une grosseur approximative de 80 nm (BENDAYAN, 2002) et leur nom généralement accepté est celui de calvéoles (SIMIONESCU et al., 2002) qui désigne une vésicule dont la membrane contient de la calvéoline. La fusion de ces vésicules pourrait mener à la formation de canaux passant de bord en bord de la cellule (BENDAYAN et RASIO, 1997) avec ou sans la participation des organelles (DVORACK et FENG, 2001). De plus, la présence de canaux en lien avec les calvéoles (OGAWA et al., 2001) ou de tubules allant d'un côté de la cellule vers un autre est fréquemment avancée et il est probable que les tubules et les vésicules soient l'expression d'une même réalité qui n'est pas encore bien caractérisée (BENDAYAN, 2002). De ces incertitudes dérivent l'expression système vésiculo-tubulaire utilisé dans le texte. Dans le cas des vésicules, BENDAYAN (2002) a émis la probabilité d'un mécanisme ordonné et structuré semblable à celui connu pour la neurotransmission, soit l'entrée de macromolécules dans des vésicules, la fermeture de ces vésicules et leur

internalisation pour enfin migrer vers l'autre côté de la cellule. C'est à ce moment qu'il y aura relâche des macromolécules capturées de l'autre côté de la cellule.

Dans sa revue de littérature, BENDAYAN (2002) a aussi dévoilé certains résultats d'expériences de transport de molécules au travers de l'endothélium de réseaux complexes d'artères et de veines très près l'un de l'autre (rete mirabile). Ce dernier et son équipe ont évalué le transport par une technique utilisant l'immunocytochimie de nombreuses molécules allant de la TRH à de très grosses molécules comme les IgM. Toutes les molécules retrouvées au travers des cellules endothéliales étaient associées avec le système vésiculo-tubulaire. De plus il a été démontré que l'insuline et l'albumine ne prennent pas les mêmes systèmes vésiculo-tubulaires et qu'il y aurait donc une certaine spécialisation de ces structures (BENDAYAN et RASIO, 1997). Toutefois, l'albumine et les IgG utiliseraient les mêmes systèmes vésiculo-tubulaires (BENDAYAN, 2002). De plus, il est à préciser que dans le cas de l'albumine, cette dernière est présente dans seulement environ 10 % des vésicules lorsque recherchée par immunocytochimie (GHITESCU et BENDAYAN, 1992).

En ce qui a trait aux jonctions entre les cellules endothéliales, ce domaine a évolué de manière importante au cours des dernières années. Aux *zonula occludens* (tight junction) et aux *macula communicans* (gap junction) s'ajoutent maintenant les desmosomes et les jonctions adhérentes qui ont tous quatre un rôle dans l'homéostasie vasculaire (BAZZONI et DEJANA, 2004). Les *zonula occludens* sont des sections où les cellules

endothéliales sont fusionnées sous forme de petits ponts rigides. Ces complexes à plusieurs composantes sont responsables non seulement de la régulation du passage paracellulaire des solutés et solvants, mais aussi de certaines régulations géniques, de la polarité cellulaire et de certains mécanismes entrant en jeu dans la prolifération cellulaire (SCHNEEBERGER et LYNCH, 2004). Les *macula communicans* sont des ponts plus larges entre les membranes de deux cellules adjacentes qui laissent passer les ions et certains métabolites entre les cellules (RHODIN, 1980) permettant une communication entre cellules.

L'eau et les molécules d'un diamètre plus petit que 1,7 nm et d'un poids moléculaire de moins de 3000 en provenance de la lumière seraient en mesure de passer par les jonctions entre les cellules endothéliales (BENDAYAN, 2002). Allant dans ce sens, BENDAYAN (2002) et son équipe, en évaluant le transport de nombreuses molécules allant de la TRH à de très grosses molécules comme les IgM, ont remarqué que toutes les molécules étaient retrouvées au travers des cellules endothéliales et étaient associées avec le système vésiculo-tubulaire. Toutefois, seulement les plus petites molécules, telles la TRH, étaient aussi retrouvées dans les jonctions intercellulaires.

Comme nous le savons l'organisation et les fonctions des cellules endothéliales varient de manière importante selon la localisation de la cellule endothéliale (THORIN et SHREEVE, 1998). Allant dans le même sens, il est à noter que la plupart des expériences de filtration rapportées dans la littérature ont été faites sur des lits capillaires

où la présence de *macula communicans* est remise en question, ce qui n'est pas le cas en ce qui a trait aux grosses artères. De plus, nous devons différencier les situations différentes du transport au niveau de l'endothélium de l'aorte et celui au niveau des glomérules rénaux où les fenestrations sont responsables de la majorité de la filtration des macromolécules (LEVICK et SMAJE, 1987) (BENDAYAN, 2002). Fait intéressant, ces fenestrations seraient recouvertes de petites arborescences formées de protéoglycans et couvrant toute la largeur de la fenestration (ROSTGAARD et QVORTRUP, 1996).

3.3.1.2. Contribution des cellules en mitose

Bien qu'une grande partie des travaux se sont attardés aux transports transcellulaires et paracellulaires, le transport via les cellules en mitose ou en processus de mort a probablement son importance lors des phénomènes de filtration des macromolécules.

Le groupe de CHIEN et al. (1988) été le premier à émettre l'hypothèse en 1985 que le passage des macromolécules au travers de l'endothélium pouvait être relié aux cellules en mitose. L'expérience de ce groupe afin de le démontrer a été publiée dans deux journaux (CHIEN et al., 1988) (LIN et al., 1988) et consiste à observer les cellules endothéliales de l'aorte de rats après avoir perfusé in vivo une solution d'albumine marquée au bleu d'évans. Suite au prélèvement et à la coloration des noyaux des cellules, les cellules endothéliales ont été observées. Les auteurs ont observé que 99 % des cellules en mitose étaient associées avec une extravasation de bleu d'évans contrairement à 0,03 % des cellules qui ne sont pas en mitose. Toutefois, considérant la

rareté des cellules endothéliales en mitose, seulement le tiers des sites d'extravasation étaient reliés aux cellules en mitose. Un des deux articles présentait l'hypothèse des auteurs à l'effet que bien que les mitoses comptent pour 0,01 % du cycle de vie des cellules endothéliales, il est probable que les déformations géométriques des cellules reliées à la division cellulaire soient responsables d'un temps de passage possible plus long. Cette hypothèse a été prouvée par le même groupe près de 10 ans plus tard en démontrant que la proportion des macromolécules filtrées aux sites des cellules endothéliales en mitose ou en voie de mort cellulaire en rapport aux cellules normales était plus grande avec des molécules plus grandes. C'est-à-dire que CHEN et al. (1997) ont observé que le horseradish peroxydase (4-5 nm) était en mesure de passer plus facilement dans les jonctions normales que les molécules plus grosses et qu'une moins grande proportion de horseradish peroxydase avait besoin de passer par les sites des cellules endothéliales en mitose ou en voie de mort cellulaire. Ce n'était pas le cas de l'albumine (6 nm) (CHUANG et al., 1990) et encore moins du LDL (22 nm) (LIN et al., 1989) (TRUSKEY et al., 1992) dont une plus grande proportion passe par les sites de cellules en division ou en processus de mort.

Si nous tentons de rejoindre les expériences de cette section avec celles de la section précédente concernant le transport transcellulaire et via les jonctions intercellulaires, nous remarquons que ces expériences démontrent deux phénomènes différents. Le horseradish peroxydase, l'albumine et le LDL sont des particules qui ne passeraient pas par les jonctions entre les cellules endothéliales mais bien au travers des cellules via le

transport vésiculo-tubulaire selon les explications avancées dans la section précédente. Nous sommes donc en mesure d'harmoniser les deux phénomènes qui décrivent tous deux un processus de transport autre que les jonctions entre les cellules endothéliales en ce qui a trait aux grosses molécules. Ainsi, dans le cas des cellules en mitose ou en processus de mort, nous nous retrouvons probablement face à un phénomène où ce site se comporte comme un lit capillaire fenêtré dont les fenestrations n'ont pas de diaphragme formé de protéoglycans. Ces fenestrations ouvertes permettraient le passage des macromolécules relativement librement vers l'espace sous-endothélial. Toutefois, le fait de démontrer une augmentation de l'extravasation à certains endroits précis correspondants aux cellules en mitose ou en processus de mort n'invalide pas qu'une certaine proportion de macromolécules passe aussi au travers des cellules via le système vésiculo-tubulaire. Effectivement, un protocole en microscopie électronique a été utilisé par CHEN et al. (1995) dans le cas de horseradish peroxydase. Cette dernière molécule est assez petite pour passer via les jonctions entre les cellules endothéliales et il n'est donc pas étonnant de démontrer sa présence aux sites des jonctions cellulaires normales et au niveau des cellules en mitose ou en voie de mourir. Comme discuté dans la section précédente, dans le cas des molécules plus grosses, comme l'albumine, qui empruntent le réseau vésiculo-tubulaire, il aurait été intéressant de concevoir un protocole visant à étudier le passage de l'albumine au travers du système vésiculo-tubulaire en lien avec l'albumine passant via les cellules en mitose ou en processus de mort. Enfin, dans le cas où nous pourrions harmoniser les deux phénomènes, aucune réponse n'est actuellement disponible en ce qui a trait à la proportion de macromolécules passant via le système

vesiculo-tubulaire en rapport à la proportion de macromolécule passant aux sites des cellules en mitose ou en processus de mort. Ce phénomène devra être étudié et certaines réponses devront être apportées afin d'améliorer les modèles de filtration au travers des endothéliums.

3.3.2. Protocole de visualisation de l'endothélium en microscopie électronique à balayage

Nous avons utilisé les aortes en provenance des expérimentations de filtration qui sont présentées dans le chapitre précédent. Ces expériences ont été pratiquées chez des lapins mâles albinos New Zealand de 2,7 à 2,9 kg.

Immédiatement à la fin du protocole de filtration, pendant que l'aorte thoracique baignait encore dans une solution physiologique de Krebs maintenue à 37 °C et oxygénée, nous avons remplacé la solution de Krebs avec BSA-FITC qui baignait l'intérieur de l'aorte pour une solution constituée de glutaraldéhyde 0,5 % *p*-parafolmaldéhydes 2,5 % dans PBS 0,1 M, pH 7,4. Après 10 minutes de fixation de cette manière avec une pression interne de 50 mmHg, nous avons retiré l'aorte du bain pour la diviser en divers segments pour diverses analyses. Pour l'analyse présente, nous avons utilisé l'aorte thoracique distale.

Le segment d'aorte choisi a ensuite été placé dans un récipient contenant la même solution de fixation. La fixation a été poursuivie pour un total d'au moins 24 heures,

mais moins de 4 jours. Les échantillons ont alors été lavés deux fois dans le tampon PBS pour ensuite être post-fixés dans l'Osmium (OsO_4).

Les échantillons ont ensuite été lavés à l'eau distillée deux fois pour ensuite être déshydratés dans des solutions contenant des concentrations progressives d'éthanol (30%-40%-50%-70%-85%-95%-100%-100%-100%). Les échantillons ont ensuite été soumis à un séchage au point critique (Critical Point Drying) avec un séchoir de marque LADD.

Tous les spécimens ont ensuite été pulvérisés en surface d'une couche d'or et de palladium par un appareil ANATECH LTD HUMMER VI pour ensuite être observés par un microscope électronique à balayage JEOL JSM 840A. Les photographies ont été prises par une caméra HITACHI et ont ensuite été numérisées avec le logiciel QUARTZ PCI version 5.

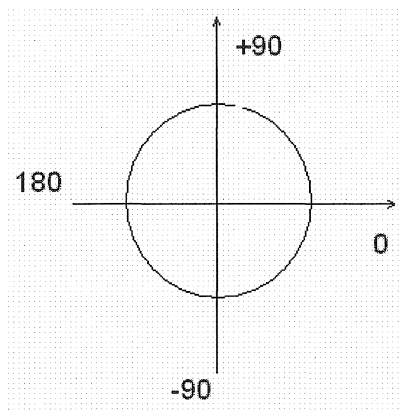


Figure 8 Axes pour décrire la direction du flot

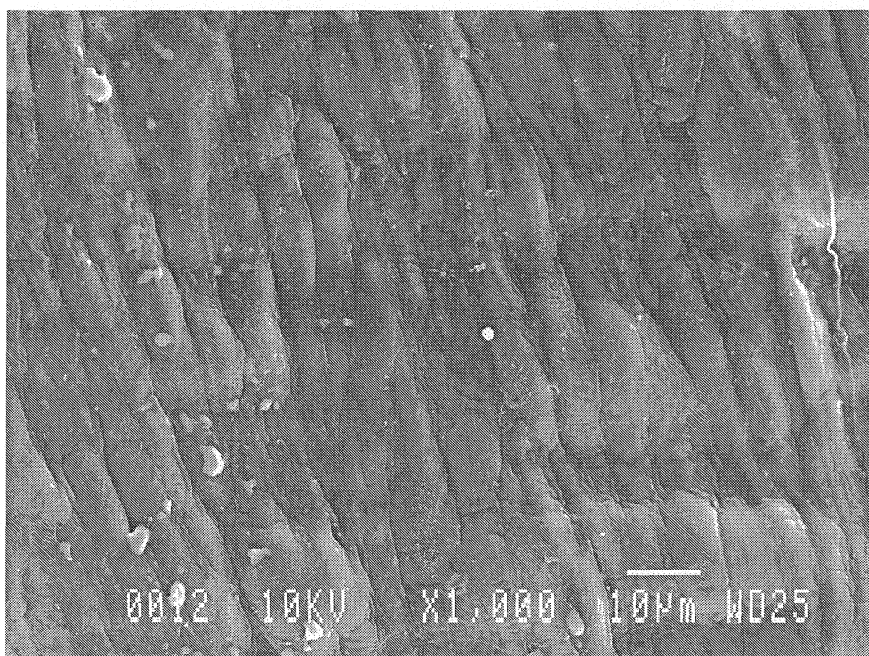


Figure 9 Endothélium de l'aorte thoracique de lapin

Fixation effectuée à une pression interne statique de 100 mmHg et avec un étirement correspondant à la longueur dans l'animal. Les bombements correspondent aux noyaux. Le flot est dirigé selon l'axe vertical.

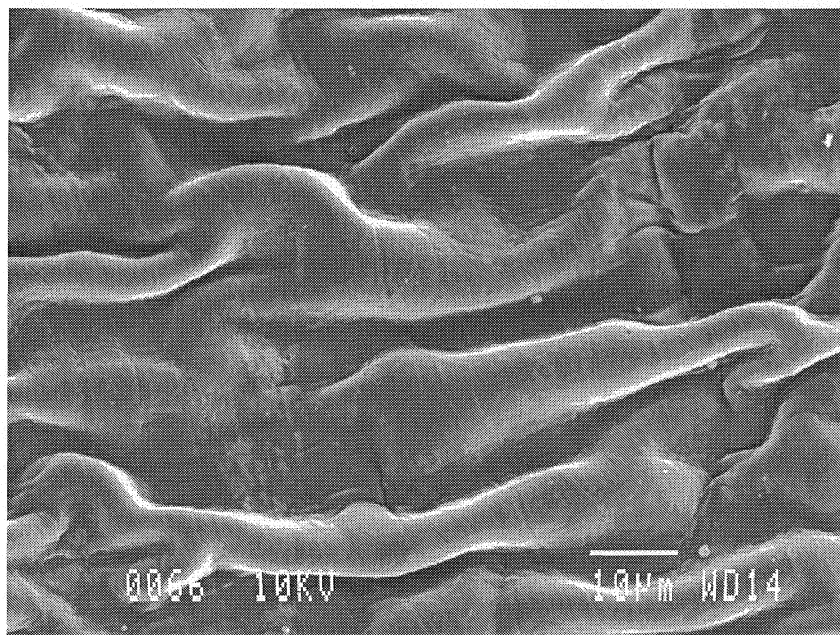


Figure 10 *Endothélium de l'aorte thoracique de lapin au repos*
La fixation a été effectuée dans cette situation sans pression interne et sans étirement de l'aorte à sa longueur physiologique. Remarquez que dans cette situation, le flot est selon l'axe vertical.

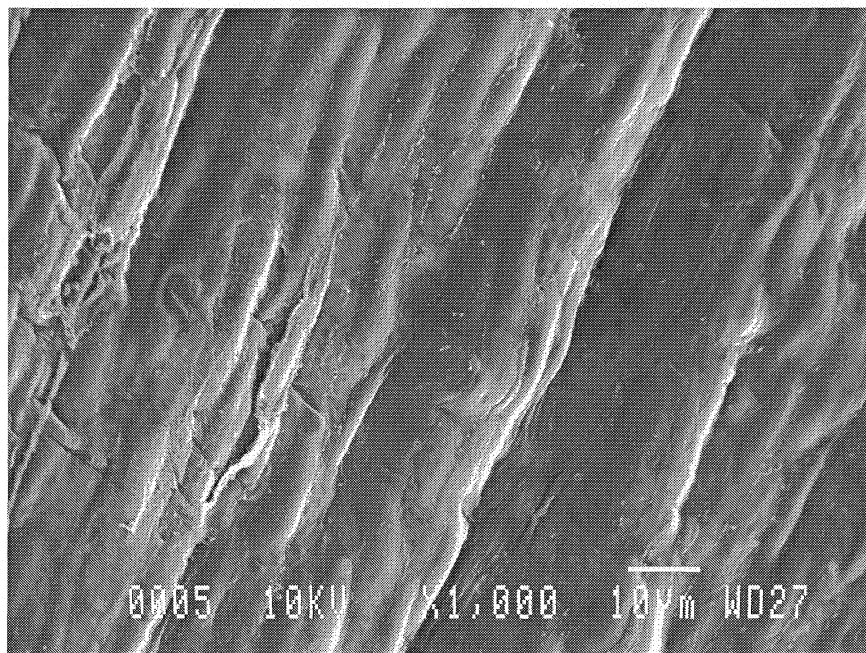


Figure 11 *Endothélium légèrement endommagé de l'aorte thoracique de lapin*
Aorte fixée in vitro à une pression interne statique de 50 mmHg
avec l'aorte étirée à sa longueur physiologique. Des replis de la
paroi aortique sont présents, ce qui n'était peu ou pas le cas avec
100 mmHg de pression interne. Le flot est selon l'axe vertical.

3.3.3. Protocole de visualisation de l'endothélium en microscopie électronique à transmission

Le protocole suivant est le même qui a été utilisé pour les tissus présentés dans le cadre d'études morphologiques en microscopie électronique à transmission dans les sections suivantes.

Nous avons utilisé les aortes des expérimentations de filtration qui sont présentées dans le chapitre 4. C'est donc dire que nous avons utilisé les aortes de lapins mâles albinos New Zealand de 2,7 à 2,9 kg. Nous avons aussi commencé à utiliser des aortes de rats afin de tenter de développer de nouvelles possibilités et débouchés aux expériences en cours. Ainsi, immédiatement à la fin du protocole de filtration présenté au chapitre 4, alors que l'aorte thoracique baignait encore dans une solution physiologique de Krebs maintenue à 37 °C et oxygénée, nous avons remplacé la solution de Krebs avec BSA-FITC qui baignait l'intérieur de l'aorte pour une solution constituée de Glutaraldéhyde 0,5 % *p*-parafolmaldéhydes 2,5 % (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.) dans 0,1 M de PBS à pH 7,4. Après 10 minutes de fixation de cette manière avec une pression interne de 50 mmHg, nous avons retiré l'aorte du bain pour la diviser en divers segments pour diverses analyses. Dans le cas d'un des anneaux de l'aorte thoracique destiné pour les études morphologiques et l'immunocytochimie, la fixation a été poursuivie pour un total de 2 heures à température ambiante avant que les échantillons soient rincés deux fois avec une solution de PBS 0,1 M. Les tissus ont alors été incubés

dans du tetroxide d'osmium 2% (FISHER Scientific, NJ, É.-U.) pendant 2 heures pour être ensuite lavés deux fois à l'eau bidistillée. Les échantillons ont alors été déshydratés par des incubations successives dans des concentrations graduelles d'alcool de 50 % à 100 % pour ensuite être mis dans l'EPON (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.) et être polymérisés pendant 48 heures. Des coupes minces ont été effectuées selon la direction radiale en se fiant sur la courbure encore présente sur les sections d'aorte. Ces tranches ont été placées sur des grilles de cuivre pour observation subséquente en Microscope électronique HITACHI H7500 suite à une coloration avec de l'acétate d'uranyl (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.) et du citrate de plomb. Ensuite, les images ont été numérisées à l'aide d'une caméra numérique KODAK MEGAPLUS Camera Model 1,6 pour être ensuite traitées avec le logiciel A.M.T. V 2.25.5.

Il est à noter que ces coupes semi-fines en provenance de ces sections d'aorte ont été incubées de manière brève dans une coloration toluidine afin de faire une évaluation générale de la morphologie des coupes en microscopie optique. La solution toluidine est constituée de Azur II 1 % (BDH Chemical, Toronto, Canada), de bleu de méthylène 1 % (JT Baker Chemical, NJ, É.-U.) et de Borate de sodium 1%. Les coupes radiales en microscopie optique de l'aorte présentées lors des sections suivantes ont été préparées de cette manière. L'observation a été effectuée avec un microscope Axioskop 2 (ZEISS) appareillé d'un système pour microscopie à fluorescence et contraste de phase de SPOT Diagnostic Instruments Inc. Les images ont été acquises avec le logiciel SPOT V 1.2.1.

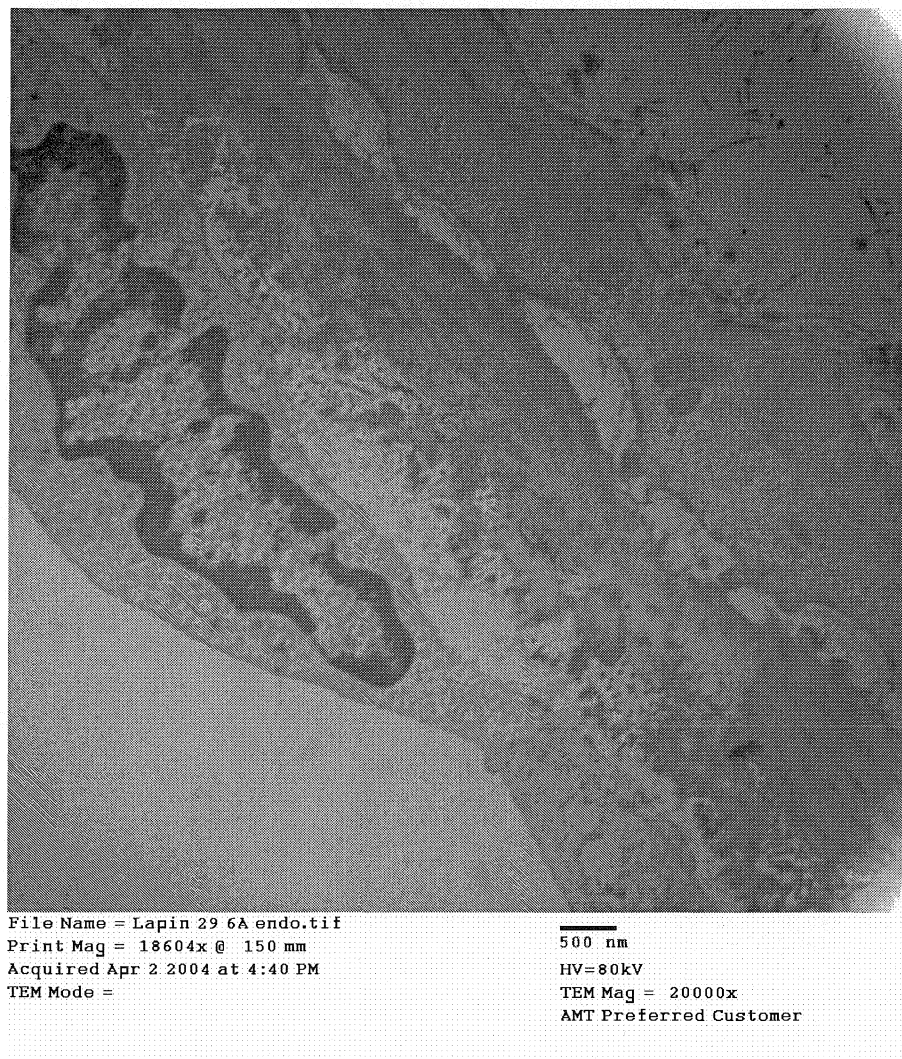


Figure 12 *Endothélium de l'aorte thoracique de lapin (microscopie électronique à transmission)*

Aorte fixée in vitro à une pression interne de 50 mmHg.



Figure 13 *Endothélium de l'aorte thoracique de rat (microscopie électronique à transmission)*

Aorte fixée suite à une exposition in vivo de BSA-FITC. Nous pouvons remarquer certaines vésicules en plus de la jonction entre deux cellules endothéliales.

3.3.4. Protocole de Coloration des cellules endothéliales avec AgNO₃

L'objectif est de visualiser la surface interne de l'aorte afin d'être en mesure de mesurer l'aire des cellules endothéliales et d'avoir la possibilité de faire des études subséquentes à partir de la technique pratiquée. Il est donc nécessaire d'effectuer une coloration des jonctions des cellules endothéliales afin d'être en mesure de calculer l'aire de ces cellules. La technique en tant que telle est inspirée d'un protocole bien établi (GABALDON, 1987) et réutilisée dans d'autres études par la suite sous diverses variantes (CURMI et al., 1990). Cette technique est intéressante, car une fois bien maîtrisée, elle nous permet d'avoir un aperçu de l'état des cellules endothéliales suite à un stress comme une infection (GABALDON, 1987) ou un stress mécanique. La technique nous permet aussi de fixer les cellules endothéliales dans l'état d'étirement que ces dernières avaient au moment de la fixation (CURMI et al., 1990).

3.3.4.1. Protocole de coloration utilisé

Nous avons utilisé les aortes en provenance des expérimentations de filtration qui sont présentées dans le chapitre 4 pour faire nos premières images, mais considérant la difficulté technique importante, nous n'avons pas été en mesure de photographier l'endothélium de l'aorte de ces lapins. Le protocole qui suit a donc été réalisé plus tard sur des lapins mâles albinos New Zealand de 2,7 à 2,9 kg sans que la région d'intérêt de l'aorte n'ait été soumise à d'autre perfusion ou protocole.

En suivant un protocole identique à celui décrit au chapitre 4 pour la préparation des aortes pour la filtration in vitro, nous avons obtenu des aortes thoraciques montées sur des tubes de lévine 12F, dont les artères intercostales ont été ligaturées, l'étanchéité vérifiée et la viabilité préservée.

À l'aide du même système de robinets utilisé pour les protocoles de filtration in vitro présenté au chapitre 4, nous avons effectué une perfusion de l'intérieur de l'aorte avec des solutions pour fixation et coloration en suivant l'ordre et les temps de perfusion décrits par GABALDON (1987). La pression différentielle statique maintenue entre l'intérieur et l'extérieur de l'artère pour chaque solution était de 50 mmHg. La première solution était constituée du fixatif (p-parafolmaldéhyde 1 %, Glutaraldéhyde 2 % dans NaCl 6 mM dans PBS 0,1 M à pH 7,4) et était laissée pendant 10 minutes à l'intérieur de l'aorte. La fixation primaire était suivie d'un lavage statique pendant une minute avec une solution de sucrose 8,9 % dans 20 mM HEPES à pH 7,4. Ensuite, nous avons procédé à la coloration pendant une minute avec une solution de AgNO₃ 0,05 % (FISHER, Nepean, ON, Canada) dans la solution de lavage (8,9 % sucrose dans 20 mM HEPES, pH 7,4). L'intérieur de l'aorte a ensuite été exposé de nouveau à la solution de lavage pour 1 minute pour ensuite être réexposé au fixateur pour une durée de 2 minutes.

L'aorte était ensuite démontée et nous la laissons à la lumière et température ambiante pour une durée de 24 à 72 heures dans une nouvelle solution de fixateur, soit p-

paraformaldéhyde 1 %, glutaraldéhyde 2 % dans NaCl 6 mM dans cacodylate 0,1 M à pH 7,4.

À la fin de la période de fixation avec le nouveau fixateur, nous avons séparé l'adventice de la média au niveau de la limitante élastique externe (LEE) à l'aide de la technique décrite initialement par WOLINSKY (1970) à l'aide de pinces mousses. La couche contenant la média, l'intima et l'endothélium a ensuite été déposée sur une lame avec l'endothélium face vers le haut. Nous avons ensuite monté le spécimen pour observation avec du Permount et une lamelle. L'observation a été faite en microscopie optique sur un microscope optique LEITZ DM RBE. Initialement, les images ont été acquises par une caméra KODAK MDS 120 pour être transférées dans le logiciel de traitement d'images AdobePhotoShop. Il est à noter que la photographie présentée comme échantillon dans ce mémoire a été prise avec un microscope Axioskop 2 (ZEISS) équipé d'un système pour microscopie à fluorescence et contraste de phase de SPOT Diagnostic Instruments Inc. Les images ont été acquises avec le logiciel SPOT V 1.2.1.

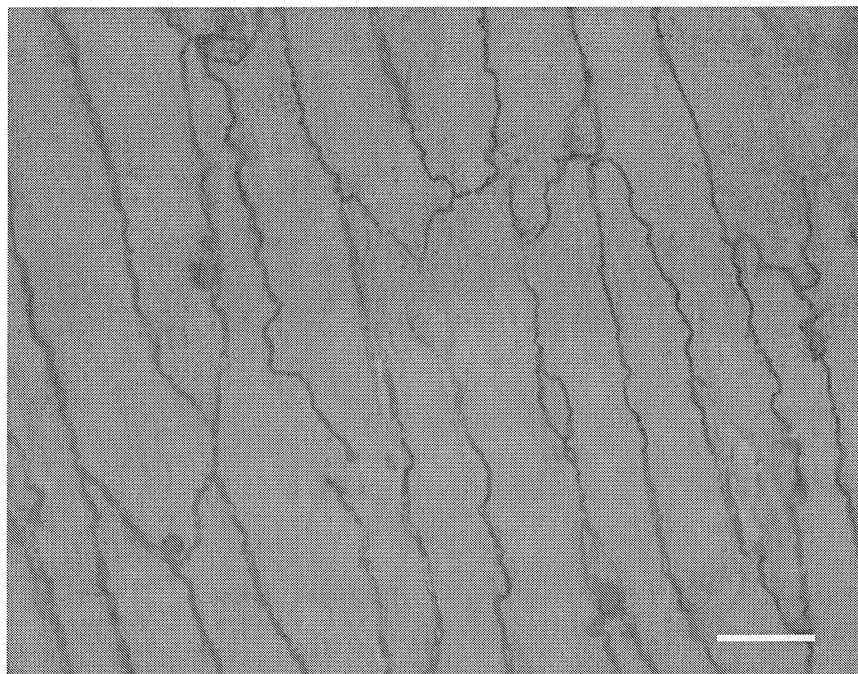


Figure 14 *Endothélium de l'aorte thoracique de lapin avec coloration à $AGNO_3$*
Aorte fixée avec 50mmHg de pression interne et aorte étirée à sa
longueur physiologique. Observation avec immersion à l'huile
(tiret 10 μm). Le flot est selon l'axe vertical.

3.3.5. Discussion

Les images de l'endothélium en microscopie électronique à balayage sont semblables à celles de TEDGUI et LEVER (1984). Nous pouvons avoir une idée de l'intégrité de la surface endothéliale au moment de la fixation, mais il est loin d'être évident que cela prouve l'intégrité de cette dernière. De plus, nous ne sommes pas en mesure d'évaluer la surface d'une cellule endothéliale, c'est pour cette raison que nous avons utilisé les colorations au nitrate d'argent. L'intérêt de l'observation de l'endothélium en

microscopie électronique à balayage pourrait résider dans l'étude des changements de structure au niveau de la couche interne de l'aorte selon diverses pressions internes. De même, c'est l'outil idéal en association avec la microscopie à transmission afin d'évaluer la surface d'une endoprothèse.

Les photographies en microscopie électronique à transmission nous permettent d'identifier les deux systèmes de transport décrits par BENDAYAN (2002), soit le système vésiculo-tubulaire et le système de jonctions intercellulaires. Toutefois, BENDAYAN (2002) précise que certaines controverses persistent encore en ce qui a trait à la présence réelle des vésicules considérant que moins de vésicules sont retrouvées lorsque les tissus sont fixés rapidement avec une technique utilisant le froid et il ajoute qu'il est bien connu qu'une structure tubulaire mal fixée en microscopie électronique ressemblera à une chaîne de vésicules. Il en est de même d'un tube recourbé. L'observation adéquate des tissus en microscopie électronique est importante dans le cadre où les mêmes grilles seront utilisées pour les expériences en immunocytochimie décrites au chapitre 4. La reconnaissance adéquate des structures d'intérêt était donc primordiale.

En ce qui a trait aux images de la face interne que nous sommes en mesure d'obtenir, elles sont très intéressantes afin d'être en mesure de connaître la surface occupée par les cellules endothéliales de l'expérience précise qui nous intéresse. De plus, nous sommes en mesure d'effectuer la coloration des noyaux à l'hématotoxylin avec une technique

classique (LEE, 1960) ou bien en empruntant le protocole décrit par GABALDON (1987). Ce protocole nous permettait donc d'observer aussi le nombre de cellules en mitose de nos expérimentations si nous le désirons (CHIEN et al., 1988). Il en est de même si nous voulons connaître les cellules en processus de mort. Pour ce faire, nous avons seulement à incuber les tissus à l'état frais avec des IgG pour ensuite faire ressortir la présence des IgG à l'aide d'anticorps anti-IgG qui sont marqués avec un substance fluorescente, par exemple du FITC. Il est à noter que nous pourrions utiliser la technique de coloration au nitrate d'argent à l'occasion des expérimentations prévues en rapport à l'influence d'un flot pulsé versus continu sur l'organisation des cellules endothéliales. De plus, cette technique pourrait être utilisée afin de suivre le processus de réendothélialisation des endoprothèses qui auront été préalablement installées.

3.4. ÉTUDE DE L'ESPACE SOUS-ENDOTHÉLIAL

Nous nous sommes peu intéressé à l'espace sous-endothélial à l'occasion de notre étude actuelle considérant que cette couche est très mince chez les lapins jeunes et sains. Toutefois, cette région est d'un très grand intérêt en recherche dans le domaine cardiovasculaire puisque les changements précoces de l'athérosclérose sont au niveau de cette couche en ayant au commencement de la maladie un épaissement de l'espace sous-endothélial. Cet épaissement est en partie secondaire à l'augmentation et à la migration du nombre de cellules musculaires lisses et de macrophages RACKLEY (2003). Ces changements sont suivis par l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans

l'espace sous-endothélial et une augmentation de la matrice extracellulaire. Tel que démontré par FRANK et FOGELMAN (1989), l'accumulation de ces gouttelettes lipidiques dans la matrice de l'espace sous-endothélial devient évidente seulement après 10 jours de diète hypercholestérolémiant chez des lapins jeunes et sains. Ces gouttelettes lipidiques pourraient être capturées en partie par le biglycan (un protéoglycan).

L'étude de ces changements nous intéresse toutefois de manière importante dans le contexte où le développement des modèles mathématiques vise en partie à expliquer la filtration des drogues au travers des parois artérielles. Cela, notamment à l'occasion de la mise en place d'une endoprothèse au niveau de la lumière de l'artère tel que le démontre le travail de certains groupes tentant de modéliser les facteurs qui régissent la libération et la dispersion des drogues à partir des endoprothèses (DELFOUR et al., 2004). Aussi dans ce sens, BALDWIN et al., (1997) ont démontré que les artères fémorales des lapins soumis à une diète hypercholestérolémiant et les artères de lapin avec athérosclérose démontrée avaient une conductance hydraulique plus grande que les artères de contrôles normaux. Les conclusions du groupe étaient que le transport des molécules de la taille de la plupart des drogues utilisées sur des tuteurs se fait un peu plus par convection que par diffusion. Selon leur modèle, ces drogues se retrouveraient donc rapidement au niveau de l'adventice. Cette dernière expérience a une très grande importance en clinique pour le développement des endoprothèses vasculaires puisque l'effet de la médication doit principalement être au niveau de l'intima.

3.5. ÉTUDE DE LA LIMITANTE ÉLASTIQUE INTERNE (LEI)

3.5.1. Implication de la LEI dans le processus de filtration

La limitante élastique interne (LEI) est formée essentiellement d'élastine et est une membrane fenestrée. Son rôle dans la filtration est probablement important mais n'est pas encore très bien défini comme le mentionnait déjà WINLOVE et PARKER (1987). Toutefois, de leurs expériences, nous avons certaines approximations de la perméabilité de cette membrane. De plus, nous pouvons émettre sans grand risque de se tromper que les macromolécules et les solutés passent probablement de manière préférentielle par les fenestrations. Cette situation a probablement une certaine répercussion au niveau physiopathologique. Effectivement, WONG et LANGILLE (1996) ont démontré que la grosseur des fenestrations de la LEI est augmentée avec l'âge et qu'il est possible d'induire une augmentation de la grosseur des fenestrations en augmentant le flot au niveau des carotides de lapins. Bien que selon nos connaissances, cela ne soit pas encore démontré, les fenestrations des LEI des mammifères hypertendus devraient donc probablement être plus grandes. Une expérience simple comparant les LEI des rats spontanément hypertendus et des contrôles pourrait nous donner une partie de la réponse.

De plus, CAMPBELL et al. (1981) ont observé que les fenestrations de la LEI étaient plus grandes près des bifurcations artères carotidiennes chez l'humain. Effectivement,

les bifurcations correspondent à un point de stagnation où les forces de surface sont plus grandes et où il y a donc davantage de flot transmural. Ces expérimentations sont très intéressantes si on les met en lien avec les modélisations mathématiques de TADA et TARBELL (2000), TADA et TARBELL (2001) et TADA et TARBELL (2004). Ces derniers arrivent aux conclusions que les cellules musculaires lisses de la média à proximité d'une fenestration de la LEI subissent un stress mécanique 100 fois plus grand que les autres. Aussi, des flots plus importants passant au travers de pores plus larges pourraient introduire des changements importants pour les cellules musculaires lisses adjacentes et pourraient contribuer à l'hyperplasie intimale et donc à l'athérosclérose. Enfin, il faut préciser que nous ne connaissons pas les mécanismes d'adaptation des fenestrations de la LEI.

3.5.2. Protocole de digestion de l'aorte

Le protocole de digestion de l'aorte avec des solutions alcalines a été développé premièrement pour l'étude en microscopie électronique sur des végétaux. Ce dernier a ensuite été utilisé afin de digérer les tissus qui ne sont pas de l'élastine au sein d'un vaisseau artériel. Le protocole que nous avons utilisé a été inspiré d'expériences faites par CAMPBELL et al. (1981) pour évaluer les caractéristiques des fenestrations de la LEI aux bifurcations des artères carotidiennes chez l'humain. Toutefois, en ce qui a trait au protocole de digestion, nous savons que ces expériences de digestion peuvent induire des erreurs dues au fait qu'avec une digestion prolongée, non seulement les autres fibres sont digérées, mais l'élastine peut l'être aussi (SONG et ROACH, 1983).

Nous avons utilisé les aortes en provenance des expérimentations de filtration qui sont présentées dans le chapitre précédent. Ces expériences ont été pratiquées chez des lapins mâles albinos New Zealand de 2,7 à 2,9 kg.

Immédiatement à la fin du protocole de filtration, pendant que l'aorte thoracique baignait encore dans une solution physiologique de Krebs maintenue à 37 °C et oxygénée, nous avons remplacé la solution de Krebs avec BSA-FITC qui baignait l'intérieur de l'aorte pour une solution constituée de Glutaraldéhyde 0,5 % *p*-parafolmaldéhydes 2,5 % dans PBS 0,1 M, pH 7,4. Après 10 minutes de fixation de cette manière avec une pression interne de 50 mmHg, nous avons retiré l'aorte du bain pour la diviser en divers segments pour diverses analyses. Pour l'analyse présente, nous avons utilisé l'aorte thoracique distale. Les spécimens collectés ont été transférés dans une solution saline isotonique (NaCl 0,9%) à 4 °C pour ensuite être utilisés dans le protocole qui suit au cours des 24 à 48 heures suivantes.

Les segments de l'aorte sont sectionnés de manière médiale de façon à dérouler les anneaux d'aorte puis fixés à l'aide d'aiguilles avec l'adventice vers le haut sur de petits radeaux de bois. Ces derniers ont été confectionnés à partir de balsa et de trombones parisiennes. Les sections d'aorte ainsi montées avaient chacune une surface approximative de 8 mm par 4 mm.

Les montages ainsi faits sont placés dans des solutions de NaOH 0,1 N à une température approximative entre 70°C et 80 °C. Cette température est garantie à partir d'un système où le bécher contenant le NaOH est immergé en partie dans un récipient d'eau chauffée à la manière d'un bain-marie. Les temps de trempage des échantillons dans le NaOH sont variables entre 60 minutes et 120 minutes afin d'être en mesure d'observer des changements au niveau des structures selon le degré de digestion entraînée.

Suite à la digestion dans le NaOH chauffé, tous les échantillons ont subi la même séquence de trempages. Ainsi, les spécimens ont ensuite été immergés dans le NaOH 0,1 N à température de la pièce pour 5 minutes pour être placés dans l'eau distillée pour 5 minutes. Les prochains trempages ont été une neutralisation avec du HCl 0,1 N pendant 2 minutes et une dernière immersion dans du salin isotonique. Tous les spécimens ont ensuite été placés pour 48 à 72 heures dans une solution de Glutaraldéhyde 2 % p-paraformaldéhyde 1 % NaCl 6 mM dans PBS 0,1 M, pH 7,4. Les tissus ont ensuite été lavés deux fois avec du PBS 0,1 M pour ensuite être fixés dans l'osmium 1 % pendant 1 heure. Les spécimens ont alors été déshydratés dans des concentrations progressives d'éthanol pour finalement être séchés par point critique. Il est à préciser que CAMPBELL et al. (1981) ont démontré qu'il n'y a pas de différence significative entre les caractéristiques des fenestrations de la LEI que le séchage soit fait par point critique ou par congélation.

Les spécimens ont ensuite été préparés pour observation en microscopie électronique à balayage sur un appareil JEOL JSM 840A selon le même protocole que les spécimens pour observer l'endothélium tel que décrit précédemment.

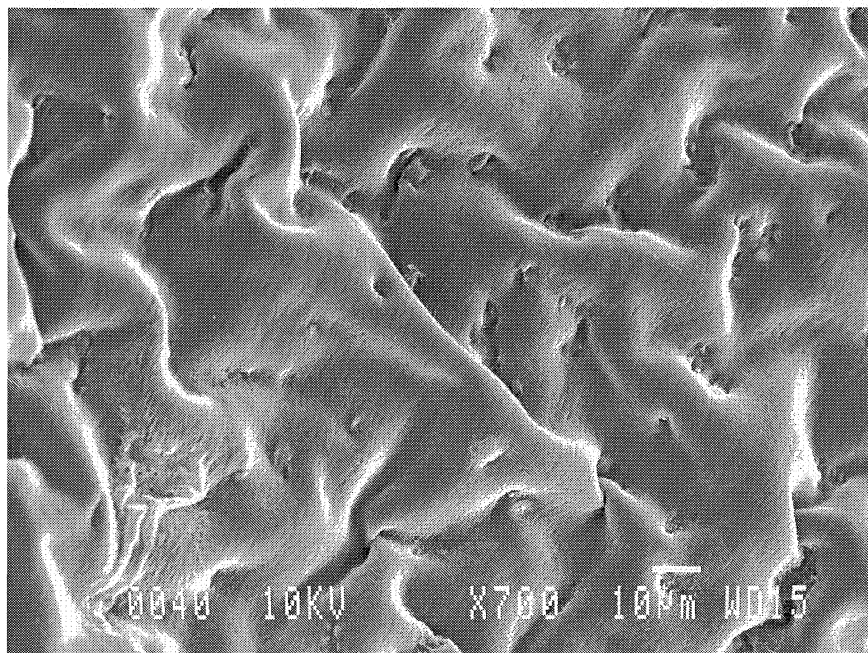


Figure 15 Pores de la LEI de l'aorte de lapin (microscopie électronique à balayage)

Vue de l'intérieur de l'aorte en microscopie électronique à balayage suite à la digestion avec des bases fortes de l'aorte. L'aorte avait été préalablement fixée avec des aldéhydes à une pression interne de 50 mmHg.

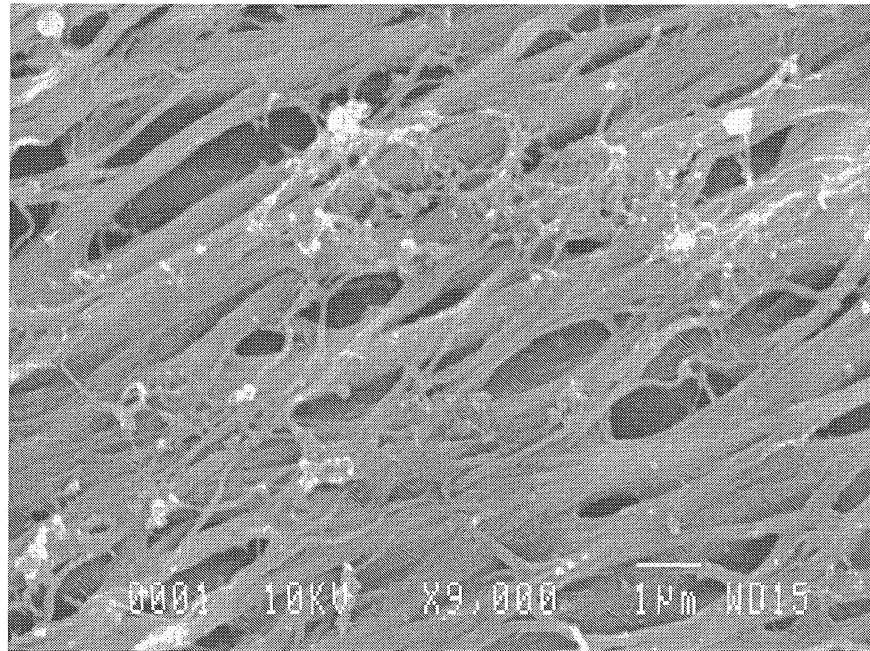


Figure 16 *Fibres de la LEI de l'aorte de lapin (microscopie électronique à balayage)*

Vue de l'intérieur de l'aorte en microscopie électronique à balayage suite à la digestion avec des bases fortes de l'aorte. L'aorte avait été préalablement fixée avec des aldéhydes à une pression interne de 50 mmHg. La direction du flot est selon l'axe des fibres soit environ 150° ou -30° .

3.5.3. Protocole pour l'étude de l'aorte en microscopie confocale

Le protocole de préparation des tissus pour la préparation des tissus pour l'observation de la LEI en microscopie confocale est inspiré du protocole utilisé par WONG et LANGILLE (1996).

Pour ces expériences, nous avons utilisé des lapins mâles albinos New Zealand de 2,7 à 2,9 kg. C'est-à-dire des lapins qui ont les mêmes caractéristiques que les lapins utilisés pour les autres expériences présentées dans ce mémoire. Nous ne pouvions toutefois pas utiliser les aortes qui avaient été exposées au protocole de filtration avec le FITC-BSA puisque la fluorescence intrinsèque de l'élastine est dans les mêmes longueurs d'ondes que celles nécessaires afin d'exciter et d'observer le FITC.

Suite au sacrifice, les aortes thoraciques distales ont été prélevées et installées sur des bouts de tube nasogastrique selon le protocole utilisé pour les expériences de filtration et décrit au chapitre 4. Ces dernières ont ensuite été placées dans le bain utilisé pour les épreuves de filtration pour une courte période d'équilibration d'environ 30 minutes en étant perfusée par une pompe péristaltique avec un goulet d'étranglement à la sortie de l'aorte dans le circuit afin de délivrer une pression moyenne d'environ 50 mmHg à l'intérieur de l'aorte. À la fin de la période d'équilibration, l'aorte a été fixée de manière statique pendant 10 minutes à une pression de 50 mmHg avec une solution de p-parafolmaldéhyde 2,5 %, glutaraldéhyde 0,5 %, CaCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM dans PBS 0,1 M à pH 7,4.

L'aorte ainsi fixée a été démontée du montage de perfusion et la fixation a été poursuivie pour un total de 30 minutes avec le même fixateur. L'aorte a ensuite été coupée en anneaux pour être ouverte transversalement et être ensuite déposée sur une lame pour microscopie avec la face interne de l'aorte (endothélium) vers le haut. Le tout

a été monté avec du Permont et finalement une lamelle pour ensuite effectuer l'observation en microscopie confocale des lames ainsi préparées. Nous avons utilisé un microscope Ellipse de NIKON TE 300 relié à un système de microscopie confocale de NORAN Instruments muni du système OZ avec Intervision.

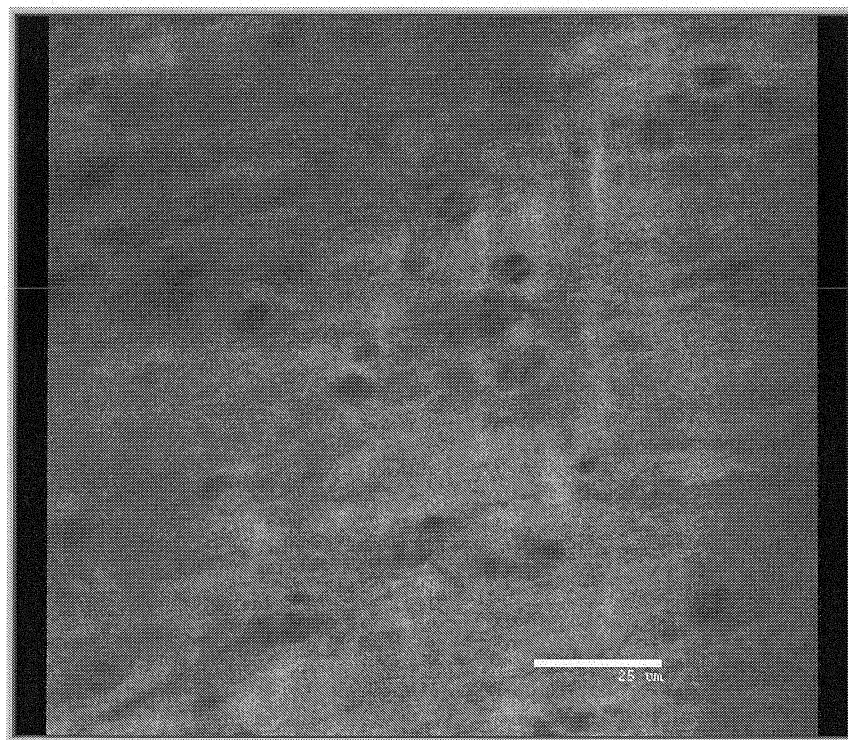


Figure 17 Pores de la LEI de l'aorte de lapin (microscopie confocale)
Microscopie confocale de la face endothéliale de l'aorte thoracique distale déroulée suite à une fixation in vitro à 50 mmHg de pression interne.

3.5.4. Discussion des résultats

3.5.4.1. Digestion de l'aorte avec des bases fortes

En ce qui a trait à la digestion de l'aorte avec des bases fortes, nous obtenons des images qui peuvent se comparer à celles obtenues antérieurement avec la même technique par CAMPBELL et al. (1981) et SONG et ROACH (1983). Toutefois, l'intérêt supplémentaire de cette expérience est que nous avons effectué des grossissements plus importants afin d'observer l'orientation des fibres. Invariablement, les fibres élastiques de la média sont orientées de manière parallèle au flot. Comme nous le verrons plus tard, l'orientation des fibres de la média est quant à elle perpendiculaire à l'axe du flot.

3.5.4.2. La LEI en microscopie confocale

Les images en microscopie confocale nous permettent d'apprécier la même structure et des pores très semblables et du même ordre de grandeur que les expériences avec digestion de l'aorte. Nous ne pouvons malheureusement rien déduire en ce qui a trait à l'orientation des fibres de la IEL en microscopie confocale du fait que nous ne pouvons pas aller à des grossissements aussi importants qu'avec la microscopie électronique. Aussi, il est important de noter que nous retrouvons une densité de pores qui est semblable à celle rapportée par WONG et LANGILLE (1996) pour des lapins sains. Enfin, notons qu'avec la quantité importante de pores retrouvées au niveau de la IEL, nous devrions probablement retrouver de temps à autre des images de ces pores sur les

coupes faites de manière radiale en microscopie électronique à transmission, ce qui n'est pas le cas.

3.5.4.3. Confirmation du lieu du passage de l'albumine au niveau des pores de la LEI

Nous avons tenté de démontrer que le FITC-BSA traversait de manière préférentielle la IEL par ses pores. Pour ce faire, nous avons observé en microscopie confocale les pores de la IEL d'une aorte à la fin d'une épreuve de filtration présentée dans le chapitre suivant. L'expérience n'a pas été concluante puisque les longueurs d'onde d'excitation du FITC sont semblables à celles de l'élastine. L'interférence était trop grande et les résultats n'ont pas été concluants. Nous pourrions toutefois tenter d'effectuer une épreuve de filtration avec de l'albumine liée à de la Rhodamine qui a une longueur d'onde d'excitation et d'émission plus longue que le FITC et l'élastine. Il est toutefois probable que l'observation soit aussi ardue avec la rhodamine puisque de nombreux signaux parasites risquent de provenir de l'espace sous-endothélial et de la média.

3.6. ÉTUDE DE LA MÉDIA

Nous aborderons ici l'étude de la média principalement en ce qui a trait à la structure de l'élastine. En ce qui a trait à la filtration, il est préférable de se référer au chapitre 4. Au sujet de la filtration, les mesures présentées ici se limitent à l'épaisseur de la média en microscopie optique. La média de l'aorte de lapin est trop épaisse pour être entièrement incluse dans un champ de microscopie électronique.

Il est à noter que nous n'aborderons pas ici le sujet des différents types de muscles lisses présents dans la paroi aortique et pouvant avoir une influence sur la rigidité artérielle et la filtration de macromolécules de par leur orientation et de par leurs caractéristiques intrinsèques (RHODIN, 1980) (KO et al., 2001).

3.6.1. Élastine et rigidité

Le groupe d'AVOLIO et al. (1998) a étudié la structure d'élastine de la média de divers animaux de différents âges et de différentes fréquences cardiaques et ayant donc eu un nombre différent de pulsations. Les résultats ont été analysés selon une méthode développée précédemment par le même groupe et utilisant une courbe fractale directionnelle (JIANG et AVOLIO, 1997). Les résultats laissent entrevoir que les altérations de l'élastine de la média sont associées avec les pulsations répétées et l'âge. Ainsi, la perte d'organisation de l'élastine et donc la diminution de l'élasticité de la média augmente le stress que doivent subir les couches plus internes de l'intima et pourrait mener à certains phénomènes athérosclérotiques.

3.6.2. Épaisseur de la média

L'épaisseur de la média varie beaucoup d'une espèce à l'autre et d'une artère à l'autre chez le même animal. Elle peut aussi varier en fonction des atteintes pathologiques de l'artère étudiée. Les présentes images se veulent uniquement une indication de l'épaisseur globale de la média, la structure en tant que telle est vérifiée en microscopie

électronique. Les lapins que nous avons utilisés avaient une média d'une épaisseur entre 150 et 170 μm .

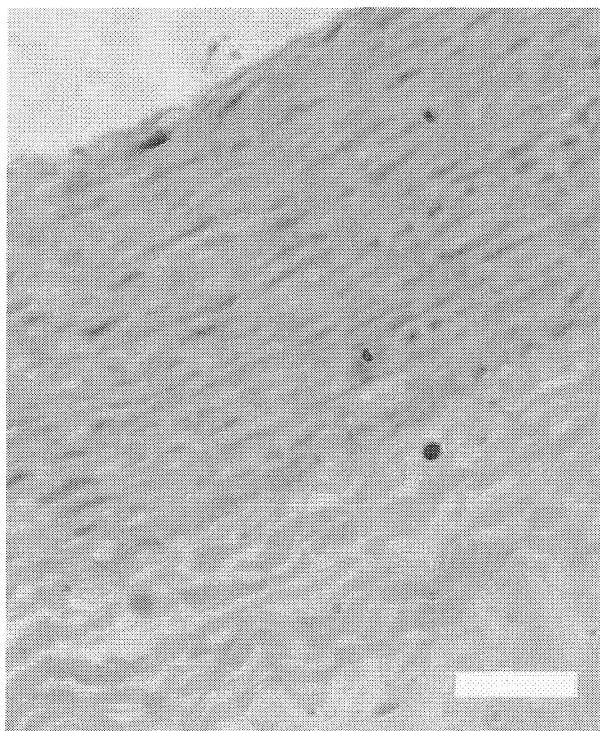


Figure 18 *Paroi de l'aorte thoracique de lapin.*

Microscopie optique avec contraste de phase sans coloration spécifique outre de la Toluidine. L'objectif étant seulement de mesurer l'épaisseur des différentes couches et non une étude histologique (tiret 50 μm).

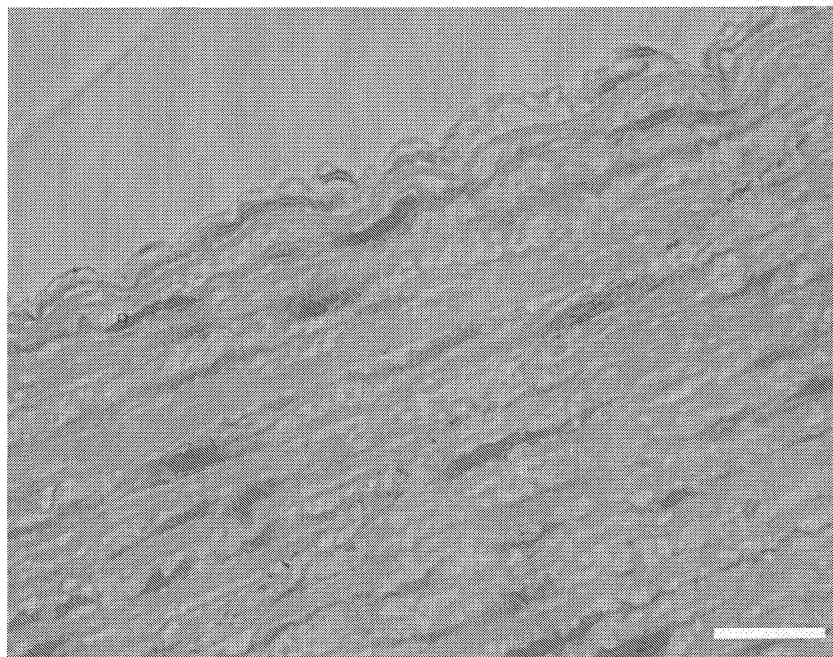


Figure 19 *Média de l'aorte thoracique de lapin.*
Microscopie optique avec contraste de phase sans coloration spécifique outre de la Toluidine (tirez 20 μm).

3.6.3. Étude de la structure de la média et en particulier de l'élastine

Nous avons étudié la média de l'aorte de lapin selon des techniques que nous avons précédemment décrites dans les sections précédentes de ce chapitre. Les animaux utilisés ont toujours été des lapins en provenance des expériences de filtration du chapitre 4 ou bien des lapins ayant des caractéristiques similaires. Ainsi, nous présentons ici les images en provenance de trois types de méthodes. La première méthode est la microscopie électronique à transmission. Cette technique permet l'étude

de la structure d'une aorte normale après fixation des coupes de l'aorte digérée par des bases fortes.

La deuxième méthode est la microscopie confocale mais avec un focus plus en profondeur dans le tissu que lors de l'observation de la LEI. La limite de la méthode est qu'il n'est pas possible d'ajuster le focus de manière plus importante dans le tissu que pour observer la première couche d'élastine de la média. Puisque les fibres d'élastine de cette couche étaient invariablement orientées selon un axe perpendiculaire au flot, nous avons tenté de savoir si les autres couches d'élastine de la média sont orientées aussi selon un axe perpendiculaire au flot. Ainsi, pour observer l'orientation des fibres des autres couches d'élastine de la média, nous avons effectué des coupes au cryostat de 4 segments d'aorte en provenance de 3 animaux différents. Les spécimens avaient été préalablement fixés de manière déroulée et plate et enrobés dans une résine (Tissue-Tek O.C.T. Compound) et congelées afin d'être coupées ultérieurement au cryostat (14 μm) et d'être mis sur des lames de microscopie. Nous avons effectué des coupes de cryostat afin d'être en mesure d'enlever l'intima et quelques couches de média pour chacun des spécimens. L'observation subséquente des fibres d'élastine des autres couches de l'aorte démontre bien que ces dernières ont la même organisation et la même structure pour toute l'épaisseur de la média. Il est à préciser que nous sommes actuellement en voie de valider que la fluorescence des fibres observées ne provient pas de fibres de collagène, mais bien d'élastine en effectuant une digestion du collagène avec des bases fortes avant l'observation de la média en microscopie confocale.

La dernière technique utilisée a été l'observation en microscopie électronique à balayage du côté externe des aortes digérées avec des bases fortes. Cela, afin d'observer la structure des fibres d'élastine sur le côté externe de l'artère donc le côté externe de la média.

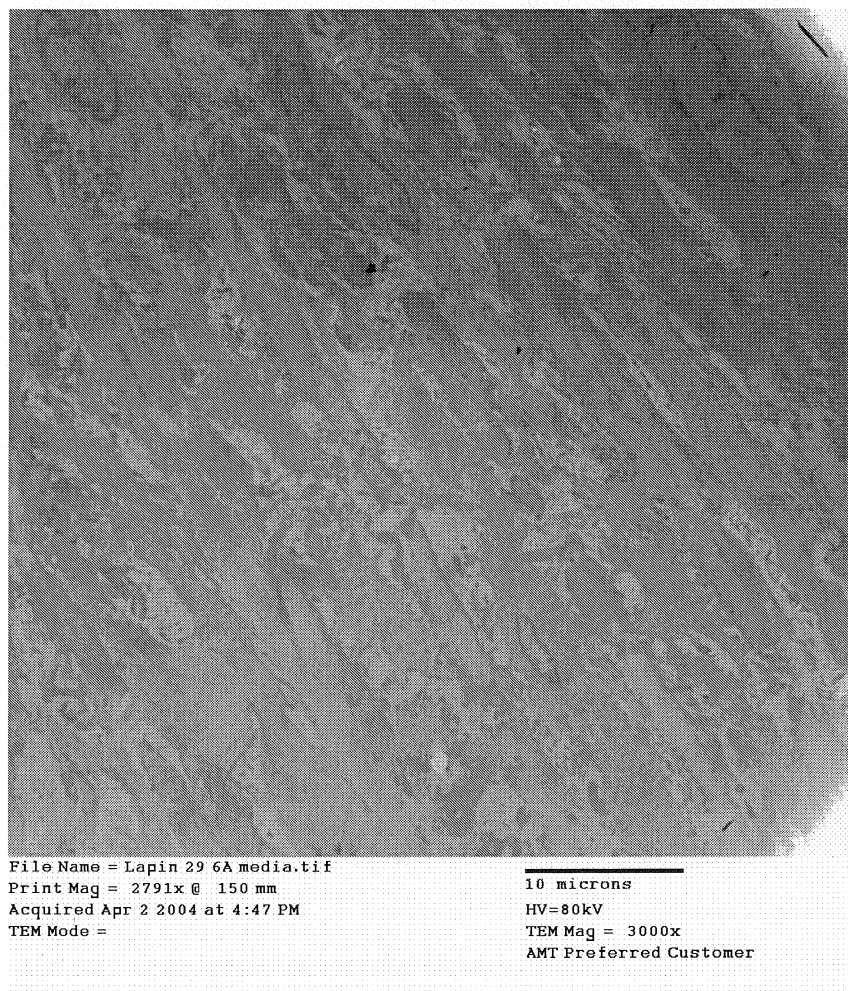


Figure 20 *Structure de la média de l'aorte thoracique de lapin (microscopie à transmission)*

Tissus fixé in vitro à 50 mmHg de pression interne suite à une exposition au FITC-BSA.

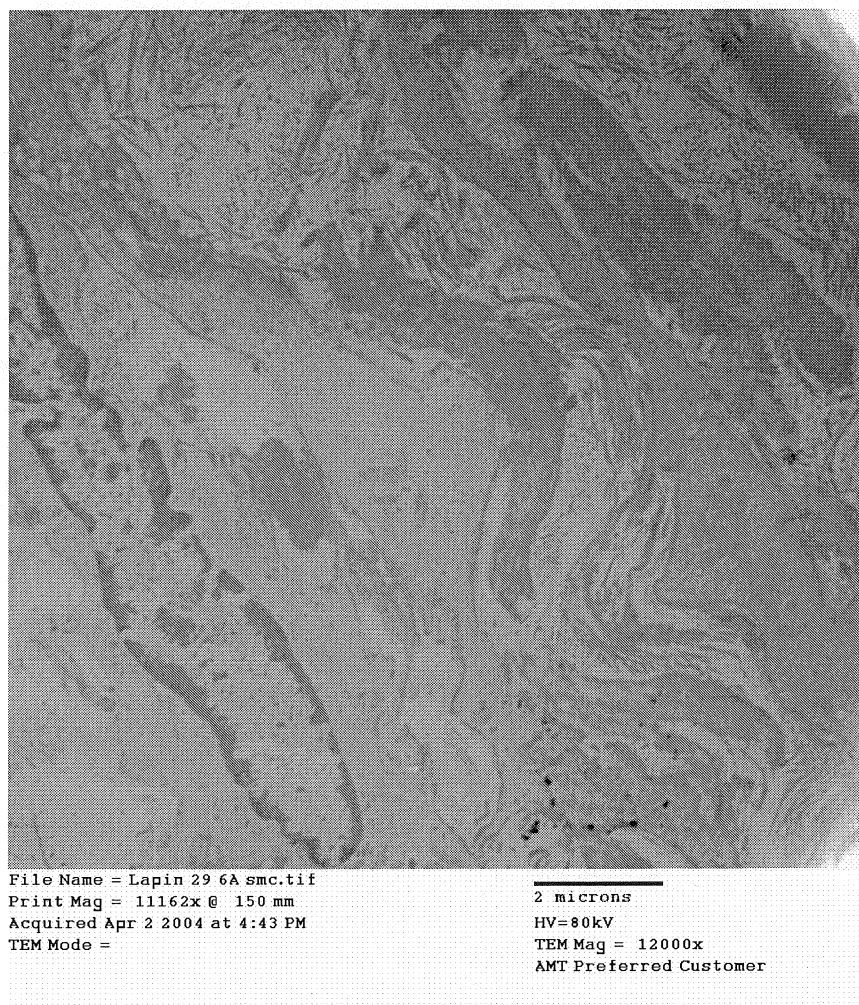


Figure 21 *Structure de la média de l'aorte thoracique de lapin (microscopie à transmission)*

Tissus fixé in vitro à 50 mmHg de pression interne suite à une exposition au FITC-BSA.

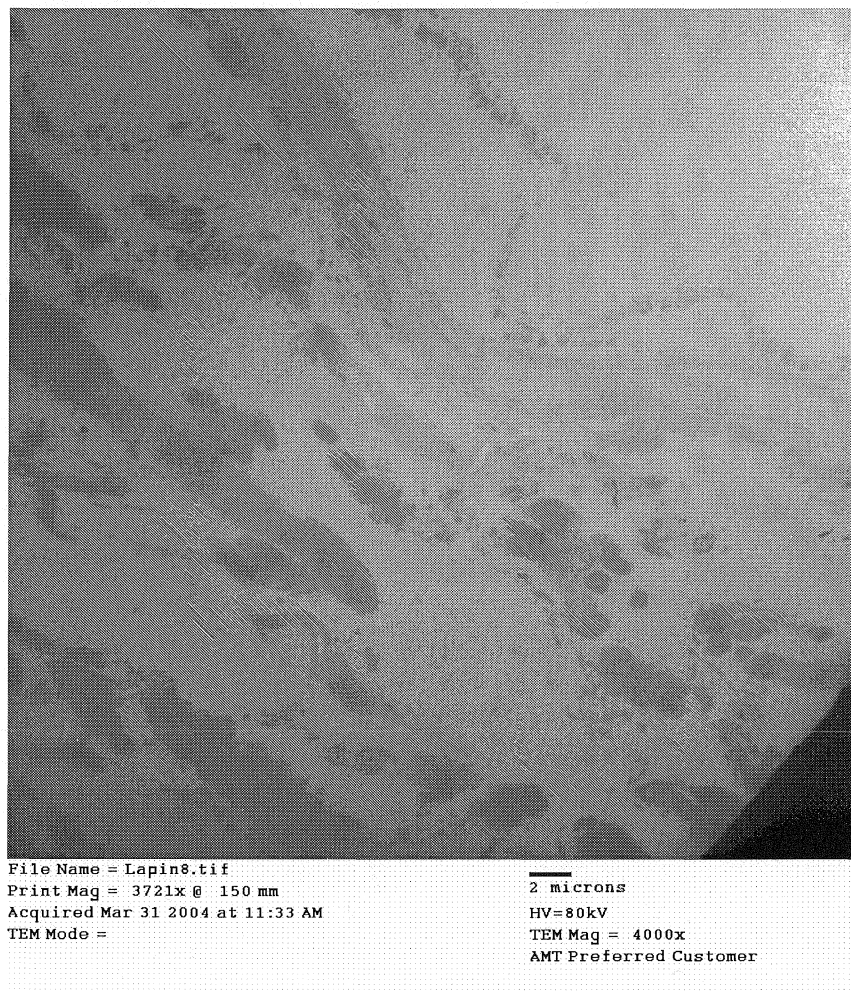


Figure 22 *Couches élastiques de l'aorte thoracique de lapin*
Microscopie à transmission de l'aorte thoracique de lapin suite à une digestion avec des bases fortes. La LEI est la première couche en haut de la photographie et la coupe n'est probablement pas radiale mais longitudinale.

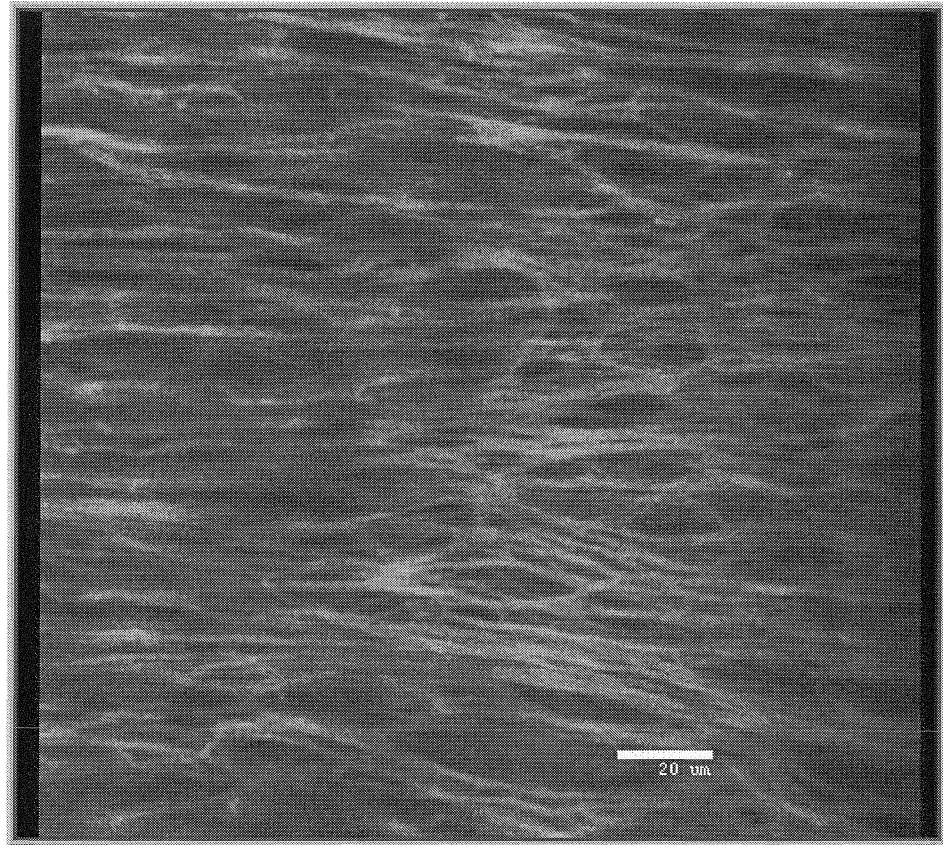


Figure 23 *Fibres de la média de l'aorte thoracique de lapin (microscopie confocale)*
Tissus fixé in vitro à 50 mmHg de pression interne et à la longueur physiologique de l'aorte. Le flot est dans la direction perpendiculaire à l'orientation des fibres.

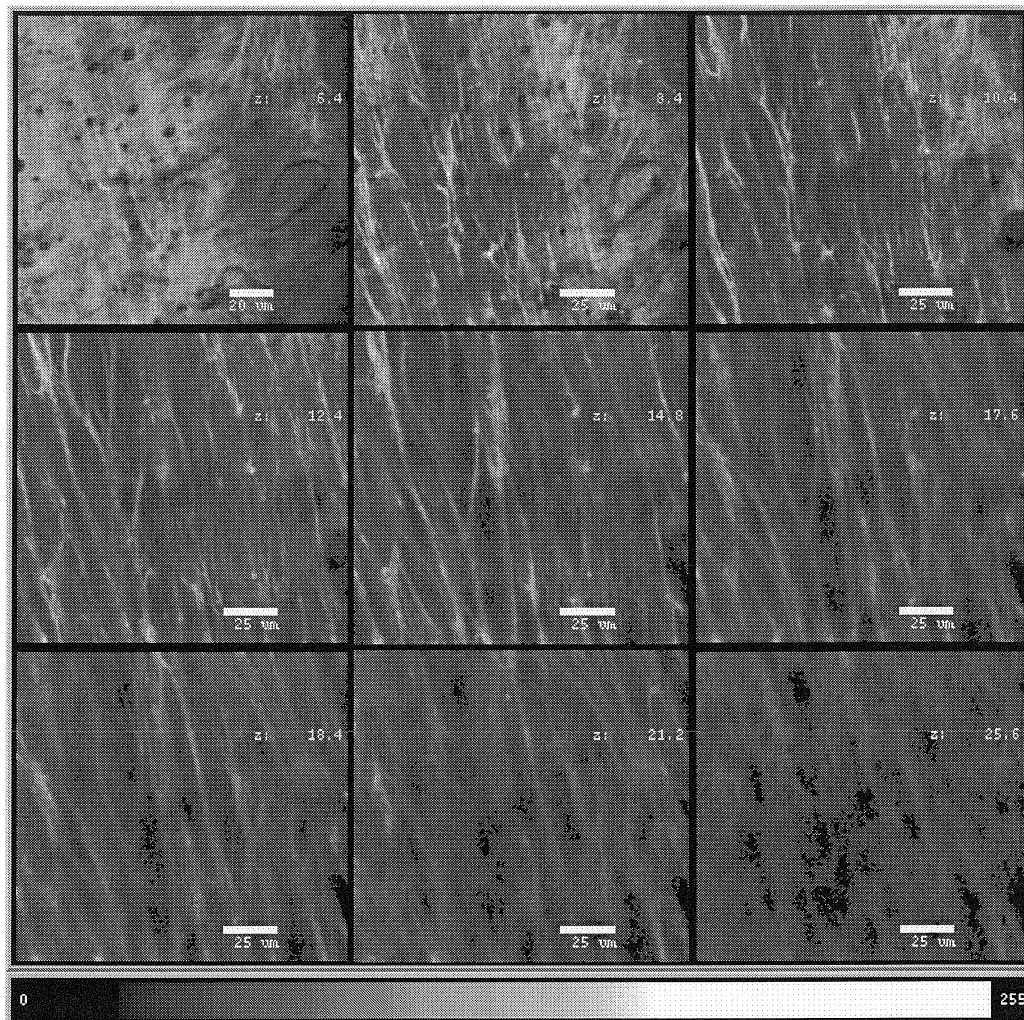


Figure 24 *Élastine de l'aorte thoracique de lapin (microscopie confocale)*

Tissus fixé in vitro à 50 mmHg de pression interne et à la longueur physiologique de l'aorte. Le flot est dans la direction perpendiculaire à l'orientation des fibres.

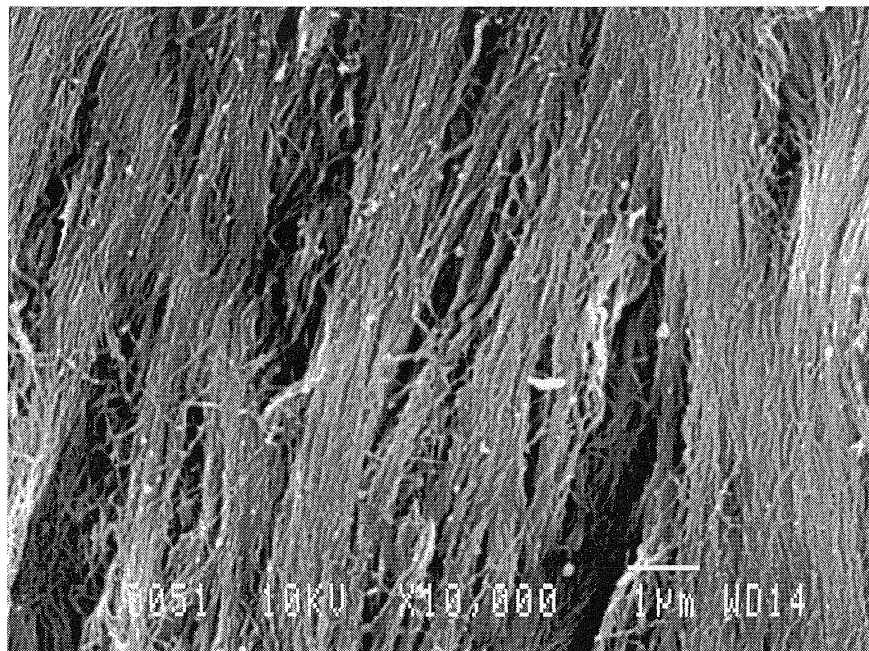


Figure 25 *Fibres élastiques de la paroi externe de l'aorte thoracique de lapin*
Microscopie électronique à balayage suite à la digestion de
l'aorte avec des bases fortes. Image d'un motif général
d'organisation des fibres d'élastine.

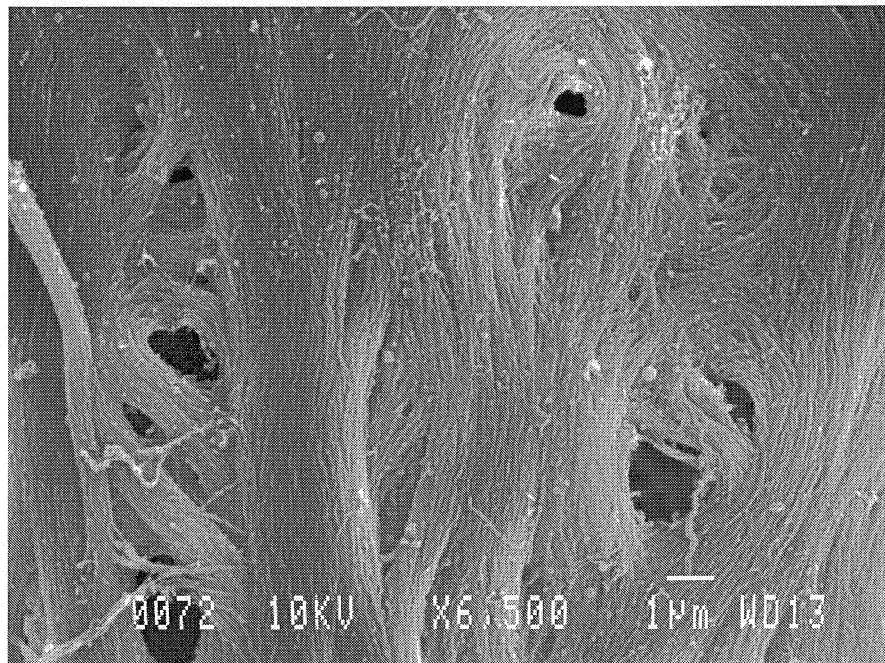


Figure 26 *Fibres élastiques de la paroi externe de l'aorte thoracique de lapin*
Microscopie électronique à balayage suite à la digestion de
l'aorte avec des bases fortes. Image d'un motif particulier de
fibres d'élastine.

3.6.4. Discussions

De ces résultats, nous sommes en mesure d'émettre un modèle d'organisation des fibres élastiques en ce qui concerne l'aorte thoracique. Effectivement, les fibres d'élastine de la LEI sont très rapprochées entre elles avec certaines structures régulières qui forment des pores. L'orientation des fibres d'élastine de la LEI est perpendiculaire à l'axe du flot. En ce qui a trait à la média, les couches de fibres sont organisées de manière perpendiculaire à l'axe de l'artère, ce qui est logique puisque ces dernières sont capable

d'assurer leur rôle de soutien de manière plus adéquate ainsi. De plus, nous pouvons émettre une hypothèse en ce qui a trait au nombre de couches de fibres d'élastine de la média et à l'organisation générale de ces dernières afin de présenter un modèle intégré de la structure générale des fibres élastiques de l'aorte dans la figure ci-après.

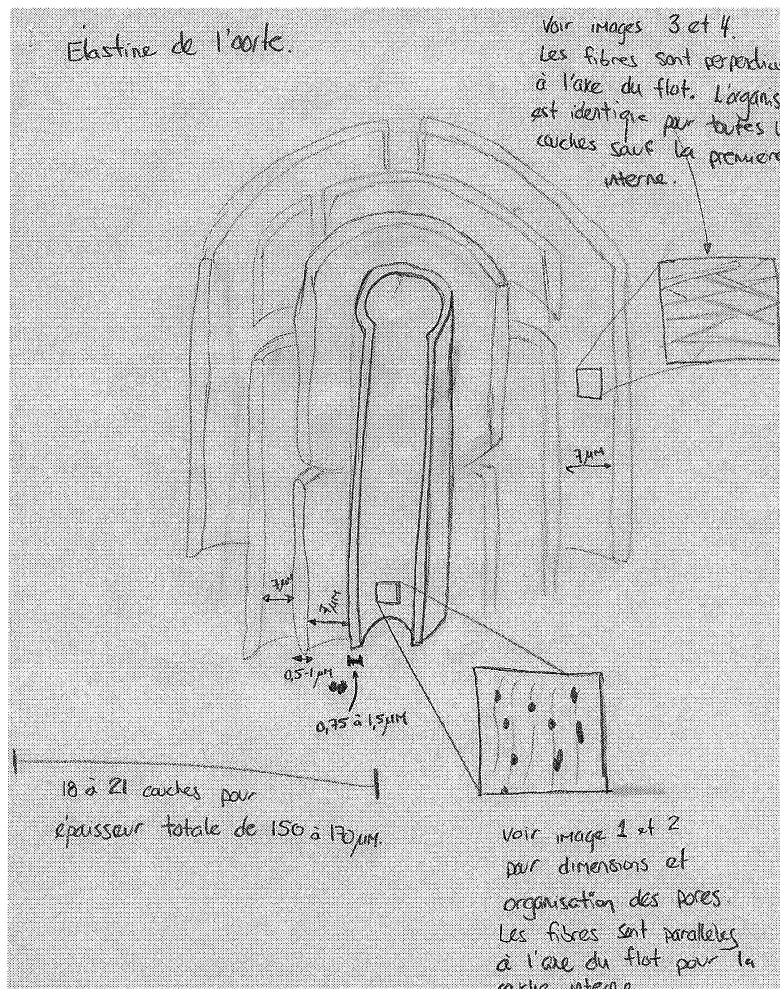


Figure 27 Organisation générale proposée des fibres d'élastine de l'aorte (sera remplacée par un graphique fait par une graphiste professionnelle.)

Afin d'améliorer le modèle de structure de l'élastine de l'aorte thoracique, nous devons aussi tenir compte des résultats du groupe de SANS et MARAGAS (1993). Ces derniers, à partir d'études d'autopsies, ont observé que les couches d'élastine sont en moyenne plus épaisses dans la portion interne (plus près de la lumière) de la média que dans sa portion externe et que cette différence est plus marquée chez les sujets hypertendus. Le même groupe a aussi redémontré que la paroi aortique était davantage fibrosée chez les sujets âgés ainsi que chez les sujets hypertendus et que la fibrose était davantage présente au niveau de l'aorte abdominale que thoracique. Nous n'avons pas tenu compte de cette variable dans l'évaluation de la structure élastique de l'aorte, mais cela devra être fait ultérieurement. Il faut toutefois préciser que ces différences de l'élastine entre l'intérieur et l'extérieur de la média n'a pas été corrélée avec un impact sur la rigidité in vivo et demeure basée sur des études d'autopsies. Dans le même sens, STERGIOPULOS et al. (2001) ont observé que le comportement mécanique de la partie interne et de la partie externe de l'aorte de cochons sains est identique.

Ce modèle de structure de l'élastine des grands troncs artériels est uniquement valide pour les artères élastiques. Effectivement, nous savons que la média des artères musculaires est formée de manière très différente avec moins de fibres élastiques et une organisation particulière des cellules musculaires lisses. De plus, la limitante élastique externe (LEE) est physiquement présente dans les artères musculaires, ce qui n'est pas le

cas en ce qui a trait aux artères élastiques de conductance comme l'aorte (RHODIN, 1980).

3.7. ÉTUDE DE L'ADVENTICE

Les vasa vasorum sont les vaisseaux responsables de nourrir en oxygène et en nutriments l'adventice et la partie externe de la média. Ces derniers originent des artères avoisinantes. Dans le cas de l'aorte thoracique descendante, l'origine des ces derniers sont les artères intercostales.

3.7.1.1. Les vasa vasorum dans certaines maladies

Les vasa vasorum ont été impliqués dans la pathophysiologie de certaines maladies dont l'athérosclérose et la faiblesse de la média qui pourrait entraîner une prédisposition à la formation des anévrismes. Cette hypothèse a été premièrement avancée par WOLINSKY et GLAGOV (1967 et 1969) qui ont suggéré que l'absence de vasa vasorum dans la partie externe de la média de l'aorte thoracique des humains pourrait être un des facteurs responsables de la prédilection de la formation des anévrismes dans l'aorte abdominale.

En ce qui a trait à l'athérosclérose, l'hypothèse que sa progression pourrait être influencée par la croissance des vasa vasorum a été émise (MOULTON et al., 1999). Allant dans le même sens, l'hypothèse que l'ischémie de la média mène à une

prolifération augmentée des vasa vasorum a été renforcée de manière élégante par le groupe de BAYER et al. (2002) qui ont aussi démontré que l'HIF-1 α , un facteur relié à l'ischémie et le VEGF, un facteur de croissance vasculaire, sont retrouvés parallèlement à une augmentation de la prolifération des vasa vasorum. En rapport à cela, la plus faible concentration d'oxygène au niveau de la paroi artérielle est retrouvée au centre de la média (JURRUS et WEISS, 1977), l'adventice et le tiers externe de la média étant suppléés par les vasa vasorum. De plus, JURRUS et WEISS (1977) ont aussi observé que la portion de la média avec une pO₂ basse est d'autant plus importante suivant le fait que l'artère devient plus épaisse comme lors de phénomènes athérosclérotiques. Cette hypoxie entraîne le développement des vasa vasorum qui pourront alors nourrir l'artère plus épaisse. Toutefois, il est loin d'être évident qu'agir sur la prolifération des vasa vasorum entraînerait une régression de la maladie athérosclérotique et non seulement une faiblesse de la média.

3.7.2. Mesures de l'épaisseur de l'adventice

L'adventice est la couche externe de l'artère. Nous avons observé que cette dernière est plus épaisse dans sa portion postérieure, lieu de la sortie des intercostales et de l'origine des vasa vasorum. Bien que nous soyons en mesure de déterminer de manière précise la jonction entre la média et l'adventice, l'emplacement des limites exactes de l'extérieur de l'adventice est plus difficile à déterminer. Nous pouvons toutefois utiliser l'épaisseur totale de la couche extérieure à la LEE comme évaluation de l'épaisseur de l'adventice. L'épaisseur de l'adventice peut donc être mesurée en microscopie optique comme nous

l'avons fait dans l'image présentée dans la section précédente de la paroi totale de l'aorte. RHODIN (1980) nous indique que l'épaisseur de l'adventice est environ 10% de celle de la paroi artérielle et que cette valeur était différente selon l'emplacement d'observation.

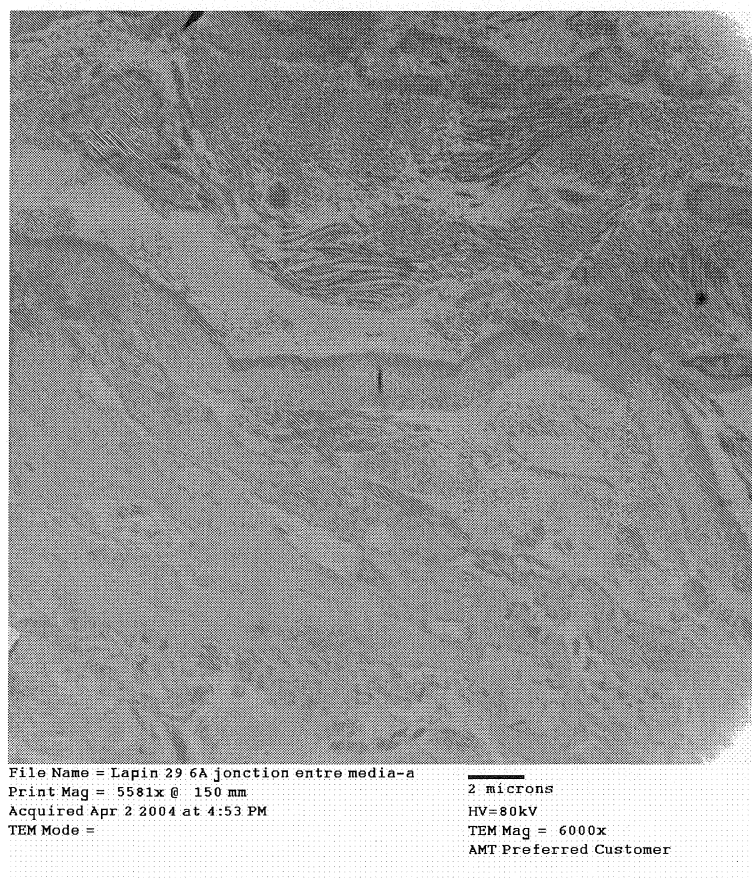


Figure 28 *Jonction média-adventice, aorte thoracique de lapin (m. à transmission)*

Tissus fixé in vitro à 50 mmHg de pression interne suite à une exposition au FITC-BSA. Comme nous l'avons déjà abordé, nous remarquons que la limitante élastique externe n'est pas une couche d'élastine distincte dans le cas des artères élastiques de conductance.

3.7.3. Moulage de l'aorte et des vasa vasorum

3.7.3.1. Protocole de moulage

Nous avons utilisé la jonction de l'aorte thoraco-abdominale d'un lapin mâle albinos New Zealand de 2,8 kg. C'est-à-dire un lapin possédant les mêmes caractéristiques que les lapins utilisés lors des expériences de filtration.

En suivant un protocole identique à celui décrit précédemment pour la préparation des aortes pour la filtration in vitro, nous avons monté sur des tubes de Lévine 12F le segment compris entre la jonction des 5^{ème} artères intercostales et ce que nous avons identifié comme étant l'artère épigastrique. Les artères intercostales ont été ligaturées et l'étanchéité du circuit a été vérifiée.

Nous avons alors préparé la résine. Le protocole de préparation de la résine est inspiré en grande partie du guide de recommandations du fabricant (WHALLEY, 1994) en ajoutant quelques modifications concernant les concentrations et l'utilisation d'un solvant. Ces modifications ont été nécessaires afin d'obtenir la viscosité voulue pour le moulage. Nous avons utilisé des masses relatives pour chacun des constituants afin de fabriquer le mélange. Nous avons utilisé 50 % de la résine BIODUR E 20 bleue (Biodur Products, Heidelberg, Allemagne) que nous avons mélangé à 25 % d'un solvant constitué de 2-Butanone (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) pour ensuite ajouter le

durcisseur, soit 25 % de BIODUR Hardener E 2 (Biodur Products, Heidelberg, Allemagne).

À l'aide d'un robinet et d'un tube flexible, nous avons introduit la résine à l'intérieur de l'aorte et induit une pression statique à l'intérieur de l'aorte à l'aide d'une colonne de résine reliée à l'aorte. Cette pression correspond à la hauteur correspondante d'eau nécessaire afin d'obtenir une pression à l'intérieur de l'aorte de 50 mmHg. Toutefois, nous savons que la pression interne de l'aorte ne correspond pas à 50 mmHg puisque le poids de la résine est différent de celui de l'eau.

L'aorte a été laissée ainsi montée pour 3 jours dans un bain d'une solution de NaCl 0,9 %. Après cette période, les deux bouts de levine reliés à l'aorte ont été séparés du reste du montage. L'étape suivante a été de digérer le tissu biologique aortique à l'aide d'une solution de NaOH 5 N à température de la pièce pendant encore 3 jours. À la fin de cette période, l'aorte était presque totalement digérée et il ne restait plus qu'à enlever délicatement les morceaux des tissus restants afin d'obtenir le moule interne du segment d'aorte intéressé.

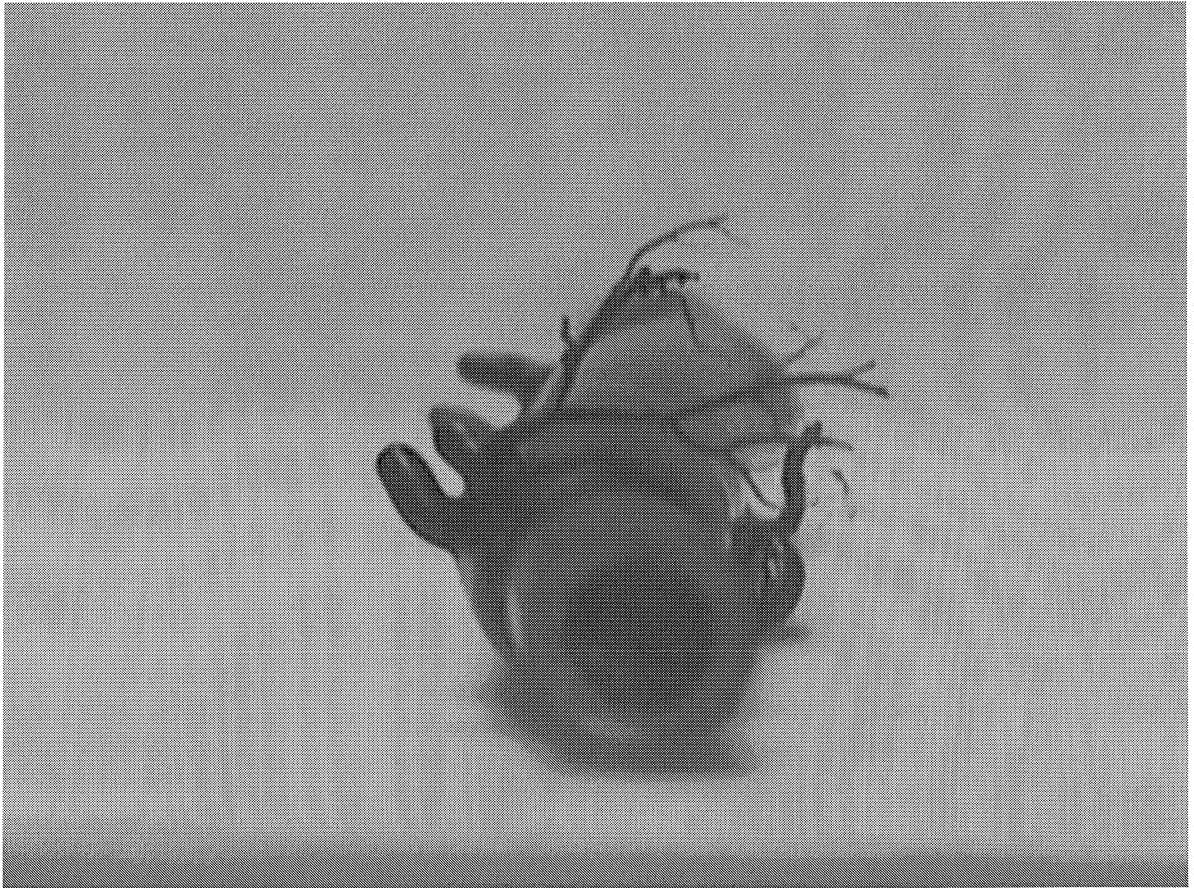


Figure 29 *Moulage de l'aorte thoracique distale de lapin*
Moulage fait à une pression interne approximative de 50 mmHg.
Il est possible de remarquer le départ d'une paire d'artères
intercostales. Au niveau de l'artère intercostale à gauche, il est
possible d'observer le départ d'une branche de vasa vasorum.

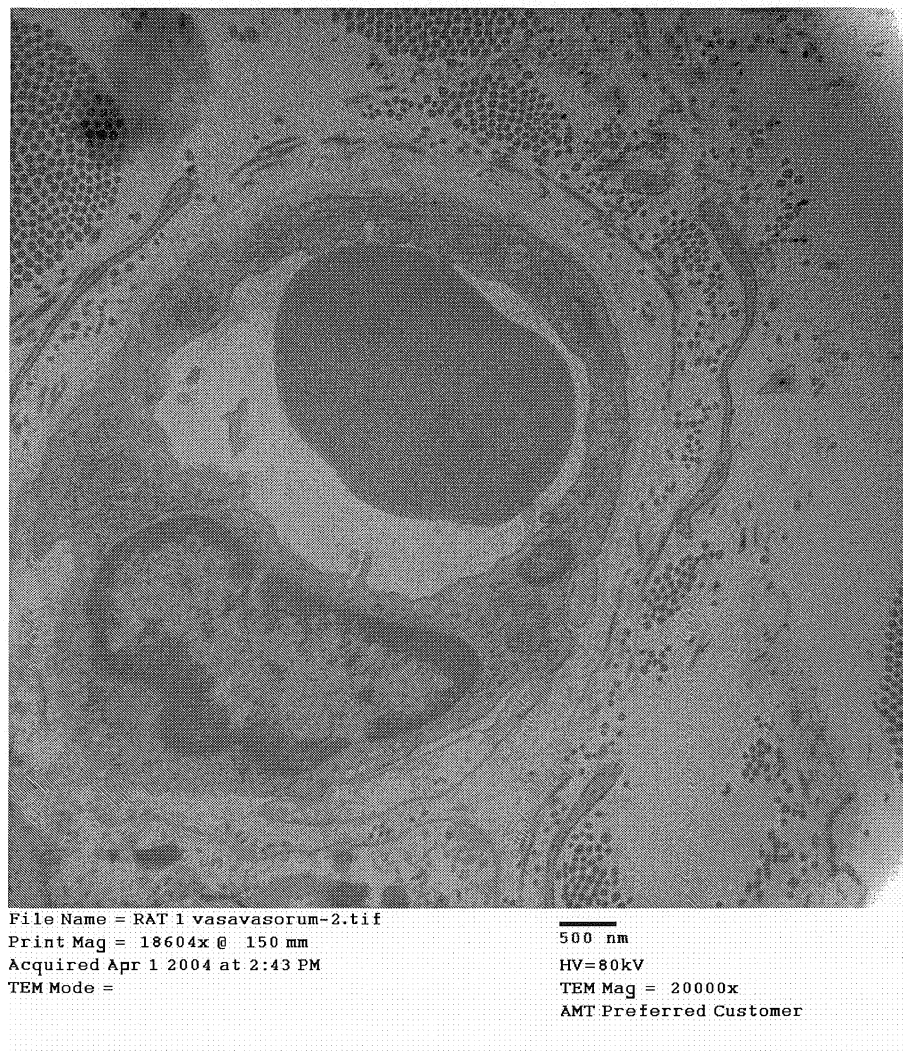


Figure 30 *Coupe radiale d'un vasa vasorum de l'aorte thoracique de rat*

3.7.4. Discussion

3.7.4.1. Distribution des vasa vasorum

En effectuant nos expériences, nous avons remarqué que les vasa vasorum sont principalement situés sur la face postérieure de l'aorte thoracique. Effectivement, lors

des coupes en microscopie électronique, nous retrouvons presque toujours des vasa vasorum lorsque que nous effectuons des coupes près des artères intercostales, ce qui n'est pas le cas lorsque nous nous limitons à examiner uniquement la paroi antérieure de l'aorte thoracique comme nous l'avons fait lors des épreuves de filtration. Le fait que les vasa vasorum pourraient être situés principalement sur la paroi antérieure coïncide avec le fait que leurs origines proviennent des artères intercostales qui ont une localisation postérieure. C'est un aspect qu'il sera nécessaire d'investiguer dans l'avenir à l'occasion de coupes pathologiques destinées uniquement à valider cette observation. Est-ce que cela pourrait avoir un impact en clinique en fragilisant de manière préférentielle la média paroi antérieure de l'aorte thoracique par manque de nutriment ?

De plus, nous pouvons aussi penser que la présence ou l'absence des vasa vasorum peut avoir un impact en ce qui a trait à la filtration puisque les vasa vasorum sont fort probablement la cause de l'augmentation de la pénétration de l'albumine dans l'adventice en comparaison à ce qui est observé dans la média. Nous présentons le profil de distribution observé dans le chapitre 4. Nous avons débuté quelques expériences de filtration in vitro afin de démontrer si le profil de filtration est différent en postérieur de l'aorte versus en antérieur de l'aorte en raison de la distribution hétérogène des vasa vasorum. Toutefois, nous devons faire une confirmation lors d'expériences de filtration in vitro. Effectivement, certains vasa vasorum peuvent être endommagés lors du prélèvement de l'artère pour les expériences in vitro et pourrait entraîner une

extravasation plus prononcée de l'albumine marquée aux sites où les vasa vasorum ont leurs origines au niveau des artères intercostales.

3.7.4.2. Utilisation future du moulage des vasa vasorum

Outre être d'intérêt pour évaluer la structure des vasa vasorum et autres structures vasculaires qui pourraient nous être d'intérêt dont les cavités cardiaques, nous n'avons pas encore utilisé le moulage de structure de manière direct dans nos expériences.

L'intérêt principal de nos expériences de moulage est que la résine utilisée peut mouler des capillaires et garder la structure interne d'origine au point que l'observation de la structure en microscopie électronique du moule est possible. Nous pourrions ainsi déterminer la structure réelle des vasa vasorum depuis leurs origines auprès des artères intercostales.

**ÉTUDE DE LA FILTRATION DE MACROMOLÉCULES
AU TRAVERS DE LA PAROI ARTÉRIELLE**

4. ÉTUDE DE LA FILTRATION DE MACROMOLÉCULES AU TRAVERS DE LA PAROI ARTÉRIELLE

4.1. MODÈLES ACTUELS DE FILTRATION

Le point de départ du projet de filtration était de tenter de valider à l'aide d'une expérience sur l'animal les modèles mathématiques actuellement avancés pour décrire la filtration au travers des artères. Effectivement, les modèles actuellement avancés prennent des données en provenance de plusieurs expériences sur différentes espèces animales afin premièrement d'avancer un modèle de filtration et à la suite de décrire mathématiquement ces comportements. Le modèle du groupe de recherche avec lequel nous travaillons à l'École Polytechnique de Montréal a développé un modèle de transport des molécules entre l'endothélium et la limitante élastique externe (LEE) (MANCEAU, 2002). Il est à préciser que le modèle est actuellement en voie d'amélioration suite à une revue plus approfondie de la littérature et à de nouvelles données. Le modèle de base de MANCEAU (2002) est inspiré des données de la littérature antérieure et se compare à celui de KARNER et PERKTOLD (2000). Toutefois, ces derniers auteurs ont déjà publié certaines améliorations à leur modèle (KARNER et al., 2001).

4.1.1. La modélisation des couches de la paroi artérielle

Ces deux groupes représentent l'artère comme étant formée de membranes et de milieux poreux. Ainsi, l'espace sous-endothélial et la média sont modélisés comme étant des milieux poreux homogènes macroscopiquement et l'endothélium et la limitante élastique interne (LEI) sont représentées comme des membranes semi-perméables continues (MANCEAU, 2002).

Nous discuterons brièvement de la manière dont les modèles représentent actuellement les diverses couches de l'artère en ce qui a trait au passage des macromolécules. Nous passerons en revues les couches à partir de la lumière en allant vers l'adventice.

4.1.1.1. La couche de surface des cellules endothéliales (CSCE)

Notons que les modèles mathématiques de référence que nous utilisons n'ont pas encore intégré la présence d'une couche de surface pour les cellules endothéliales. Plusieurs modèles de cette couche existent dont certains sont présentés au chapitre 3. Considérant l'importance probable de cette couche dans la filtration, il sera nécessaire, si possible, de déterminer davantage son importance et de l'inclure dans l'avenir au modèle mathématique de filtration.

4.1.1.2. L'endothélium

En ce qui a trait à l'endothélium, les modèles de MANCEAU (2002) et de KARNER et PERKTOLD (2000) modélisent cette couche comme étant une membrane semi-

perméable dont les pores sont les jonctions normales entre les cellules endothéliales et les sites de mitoses et de mort de cellules endothéliales (exprimés cellules de fuite). En ce qui concerne les jonctions normales, tel que présenté initialement par TSAY et al. (1989), les modèles proposent que les sites de passage des macromolécules soient une série de pores circulaires le long de la jonction normale entre deux cellules endothéliales. Dans le cas des sites des cellules en mitoses ou en processus de mort cellulaire, le modèle représente le site de filtration comme étant un anneau autour des cellules impliquées. Toutefois, tel que nous en avons discuté dans le chapitre 3, les données les plus probantes démontrent que l'albumine passe au travers des cellules par un système de transport vésiculo-tubulaire et non par les jonctions normales entre les cellules endothéliales. L'albumine passerait donc plus probablement au travers des cellules endothéliales et via les cellules en processus de mitose ou de mort cellulaire contrairement à ce qui est avancé dans la plupart des modèles mathématiques.

4.1.1.3. Espace sous-endothélial et média

En ce qui a trait à la couche sous-endothéliale, les modèles de KARNER et PERKTOLD (2000) tout comme de MANCEAU (2002) la représentent comme étant un milieu poreux constitué d'une matrice interstitielle formée principalement de protéoglycans et de collagène. Les modèles n'ont toutefois pas tenu en compte les changements de perméabilité qui sont induits par les augmentations de pression. Effectivement, il est démontré in vivo (KARMAKAR, 2001) et de manière mathématique (HUANG et al., 1997) que les couches poreuses devenaient compactées sous l'effet de la pression. Cette

compression est probablement principalement secondaire au fait de la compaction des protéoglycans limitant la circulation des macromolécules et entraînant une plus grande résistance hydraulique de la paroi. À de hautes pressions luminales, nous retrouvons donc une concentration plus élevée de macromolécules dans la paroi artérielle mais une vitesse de filtration des macromolécules plus lente (KARMAKAR, 2001). Ce comportement est celui proposé dans le cas de l'intima, mais aussi dans le cas de la média. De plus, si nous voulons modéliser cet aspect, nous devons prendre en compte que la composition en protéoglycans est différente dans la média et dans l'espace sous-endothélial (HUANG et al., 1994) et que le flot au travers des pores de la LEI peut être influencé par la compaction de la matrice extracellulaire (HUANG et al., 1997).

Aussi, il faut préciser que KARNER et PERKTOLD (2000) tout comme MANCEAU (2002) utilisent les hypothèses de HUANG et TARBELL (1997) concernant une réaction de l'albumine avec les cellules musculaires lisses de la média. Cette hypothèse a été exprimée afin de développer des modèles mathématiques et d'expliquer la formation d'un gradient qui fait en sorte que la concentration d'albumine n'est pas constante dans la paroi. L'hypothèse d'une réaction de l'albumine avec les cellules musculaires lisses de la média n'a pas été démontrée biologiquement et peut-être qu'une autre hypothèse pourrait expliquer le comportement de l'albumine sans nécessairement impliquer les cellules musculaires lisses. Comme nous le préciserons plus tard, le présent protocole pourrait nous permettre de tenter de déterminer la contribution des cellules musculaires lisses à la filtration.

4.1.1.4. L'adventice

De plus, la contribution de l'adventice n'est pas prise en compte dans l'expression des modèles actuels. C'est donc dire que nous négligeons la contribution des vasa vasorum à la distribution des macromolécules au travers de la paroi artérielle. Comme nous en discuterons ci-bas, plusieurs expériences, dont celles de TEDGUI et al. (1992), montrent que la distribution de l'albumine au travers de la paroi vasculaire suite à une épreuve de filtration suit une courbe en V avec la concentration d'albumine la plus basse au niveau de la moitié externe de la média. La remontée de la concentration observée dans l'adventice est fort probablement la résultante de la contribution des vasa vasorum.

4.1.1.5. Distribution en V de l'albumine filtrée

TEDGUI et al. (1992) ont observé une augmentation de l'albumine marquée et filtrée in vivo dans l'adventice et dans ce qui correspond à la partie externe de la média, soit une distribution en V. Cette même observation, mais d'une manière moins prononcée, a aussi été notée par MEYER et al., (1996) dans leurs expérimentations in vivo. La distribution endogène de l'albumine au travers la paroi aortique de rats suit aussi une distribution en V (LONDONO et BENDAYAN, 1989). De leurs observations, nous savons que l'albumine endogène est distribuée selon des concentrations plus élevées au niveau des couches plus près de la lumière et dans l'adventice. Il est à noter qu'au cours

de nos expérimentations, nous retrouvons aussi cette distribution en V tel que montré en microscopie à fluorescence.

4.1.2. Certains concepts importants des modèles

4.1.2.1. Contribution de la convection et de la diffusion

La convection est le transport d'un soluté dû au mouvement du solvant (généralement un fluide en mouvement) et la diffusion est le transport secondaire au mouvement aléatoire et désordonné des molécules. Les deux ont leur importance à l'occasion de la filtration des macromolécules.

TEDGUI et LEVER (1985) ont démontré l'importance de la convection en plus de la diffusion sur le passage des macromolécules au travers des parois artérielles. Pour ce faire, ils ont fait une épreuve de filtration in vitro sur une aorte pressurisée avec une pression interne de l'ordre des pressions physiologiques. L'intérieur de l'aorte était libre de traceur, mais c'était l'extérieur de l'aorte qui contenait de l'albumine marquée à l'iode radioactive. Aussi, TEDGUI et LEVER (1987) ont étudié des aortes de lapins en éliminant la contribution de la convection. Pour ce faire, ils ont pressurisé l'intérieur de l'aorte avec de l'air en présence d'albumine marquée du côté de l'adventice. Ils ont alors observé une diminution de l'entrée de l'albumine dans l'artère. Ces derniers notaient toutefois que les aortes étaient morphologiquement endommagées à la fin du protocole invalidant peut-être une partie des résultats. Heureusement, des résultats semblables ont

été obtenus par MEYER et al. (1996) en effectuant une filtration d'albumine marquée en restreignant par des tubes l'expansion du diamètre de l'aorte en réponse à une pressurisation interne. La convection induite par la différentielle de pression entre l'intérieur et l'extérieur de l'aorte est donc responsable d'une partie de l'accumulation de l'albumine dans la média. Toutefois, l'étude de l'artère se limitait dans ces expériences à la média et l'adventive, puisque les couches internes étaient perdues à l'occasion d'une expérience utilisant l'albumine marquée de manière radioactive. Finalement, il faut préciser que ces résultats ont été modélisés par KIM et TARBELL (1996) qui ont été en mesure de construire un modèle décrivant que le comportement de l'albumine dans la média.

4.1.2.2. Présence probable d'un espace d'exclusion de l'albumine

L'influence de la concentration d'albumine sur la filtration est reconnue depuis les expériences de MASON et al. (1977) ou ces derniers ont utilisé des capillaires mésentériques de grenouilles. Un protocole semblable a été repris de manière très élégante par TARBELL et al. (1988) sur des carotides de lapin. Ces derniers ont utilisé la progression d'une bulle d'air dans un tube standardisé relié au système de perfusion des carotides. Cela, avec l'objectif de déterminer la vitesse de filtration des solutions avec diverses concentrations d'albumine. La filtration mesurée était clairement de moins en moins rapide au fur et à mesure que la concentration d'albumine dans la solution augmentait, la chute de vitesse la plus dramatique se retrouvant entre les concentrations d'albumine entre 0 et de 1 %. L'explication donnée par MASON et al. (1977) et par

TARBELL et al. (1988) à la baisse de la vitesse de filtration avec des concentrations davantage importantes d'albumine est l'absorption de l'albumine dans la couche de surface de l'endothélium. Effectivement, à des concentrations supérieures à celles nécessaires afin de lier les sites de liaison protéiques des protéoglycans, l'albumine filtrerait tranquillement dans les interstices restant de la couche de surface de l'endothélium. Pour renforcer cette hypothèse, nous pouvons aussi citer que certaines molécules, telle la ferritine (TURNER et al., 1983), sont exclues de la couche de surface de l'endothélium lorsque de l'albumine est ajoutée à la solution.

Considérant ces informations, nous nous attendons à ce que la filtration de l'albumine au travers des parois soit influencée par la présence de la CSCE. Aussi, il est à noter que si nous voulons utiliser le modèle mathématique de filtration pour prédire le comportement de petites doses de médicaments, nous aurons besoin de valider si le comportement observé pour des concentrations progressives d'albumine est adéquatement expliqué par le modèle mathématique. Aussi, nous devons savoir si le médicament est influencé par un espace d'exclusion comme cela est décrit pour l'albumine et d'autres molécules.

Enfin, notons que l'espace d'exclusion de l'albumine n'est pas limité à la CSCE, mais aussi à d'autres interstices (WIGG et al., 1992) où des protéoglycans sont présents. L'influence de cette espace d'exclusion n'est pas encore tenue en compte dans le développement des modèles de filtration.

4.1.3. La modélisation du sang

En ce qui a trait au transport de l'albumine du sang vers le vaisseau, KARNER et PERKTOLD (2000), tout comme MANCEAU (2002), ne tiennent pas compte de la présence des globules rouges. Ces derniers font l'hypothèse que l'albumine a une concentration constante dans toute la lumière de l'artère. Toutefois, nous savons que la concentration de l'albumine n'est pas constante dans la lumière de l'artère jusqu'à l'endothélium. Effectivement, comme nous l'avons présenté dans le chapitre 3, le glycocalyx et la CSCE ont une influence certaine sur la concentration à laquelle est exposé l'endothélium. Ainsi, il est probablement nécessaire de considérer la couche de surface de l'endothélium comme étant une barrière de filtration en tant que telle. De plus, tel que nous le présentons au chapitre 5, si nous tenons compte de la présence des globules rouges avec une concentration interne d'albumine qui y est différente de celle retrouvée dans le plasma, nous ne pouvons pas considérer le sang comme étant un liquide où l'albumine est distribuée de manière homogène.

Les deux groupes font l'hypothèse que l'écoulement dans l'artère est laminaire et qu'ils peuvent se permettre de négliger l'effet d'une pulsation du débit sanguin. Les deux groupes se réfèrent aux conclusions essentiellement mathématiques de MA et al. (1994) afin de négliger l'effet d'un flot pulsé. Toutefois, nous n'avons pas retrouvé d'essai sur l'animal ou l'humain qui comparait les effets d'un flot pulsé versus un flot continu sur la filtration des molécules au travers des parois artérielles. Comme nous le présentons dans un autre contexte au chapitre 6, les pulsations artérielles ont probablement des effets

biologiques que nous ne sommes pas en mesure d'expliquer sur la seule base d'une différence de flot délivré. Il serait donc prématuré de conclure que les pulsations du flot n'ont aucun effet sur la filtration. Cela, d'autant plus que nous ne savons pas encore les mécanismes de régulation du système de transport vésiculo-tubulaire au travers duquel passerait l'albumine.

De plus, l'hypothèse que le genre de flot est identique pour toutes les portions du système artériel n'est probablement pas le reflet de la réalité, entre autres, au niveau des bifurcations. Enfin, nous devons préciser que ces situations sont dans bien des cas celles qui nous intéressent, car ces dernières sont souvent celles touchées le plus par les phénomènes athérosclérotiques et ont des comportements particuliers en ce qui a trait au développement des anévrismes (GORDON et al., 1981).

4.1.4. Pression différentielle utilisée

Tel que nous sommes en mesure de le déduire intuitivement, la valeur différentielle de la pression transmurale entre l'intérieur et l'extérieur de l'aorte a une influence importante sur la filtration (CURMI et al., 1990). Le choix d'utiliser une pression entre l'intérieur et l'extérieur de l'aorte de 50 mmHg a été fait pour correspondre avec les modèles mathématiques. Ces modèles posent une pression statique à l'intérieur de l'artère de 90 mmHg et de 40 mmHg à la jonction de la média et de l'adventice, soit une différence entre l'intérieur et l'extérieur de l'artère de 50 mmHg. Il faut toutefois préciser que cette valeur de pression serait à réévaluer. Effectivement, les références

données par KARNER et al. (2001) réfèrent à HUANG et TARBELL (1997) qui eux se réfèrent à TEDGUI et LEVER (1984). Les expériences in vitro de TEDGUI et LEVER (1984) utilisaient des aortes de lapins afin d'étudier la filtration en suivant la progression d'une bulle d'air dans un tube au fur et à mesure que la filtration s'effectuait. Ces derniers ont comparé les résultats obtenus selon la pression interne appliquée (70 ou 180 mmHg) et selon si l'endothélium avait été retiré de l'aorte. Ces derniers ont conclu selon leurs calculs de conductivité endothéliale que la chute de pression due à l'endothélium était de 18 mmHg dans le cas d'une pression interne de 70 mmHg. Les résultats de TEDGUI et LEVER (1984) sont intéressants, mais il ne sont pas suffisants afin de conclure que la chute de pression entre l'intérieur de la lumière et la LEE est de 50 mmHg (d'autant plus que la présence de la LEE est douteuse dans les artères élastiques de conductance). Nous avons aussi parcouru l'ouvrage de YANG (1989), une autre référence laissée par KARNER et al. (2001), sans être en mesure de trouver appui, outre en ce qui a trait à des pressions partielles d'oxygène, pour la valeur de la pression différentielle hydrostatique entre la lumière et la LEE. Ainsi, la distribution de la pression hydrostatique au travers de l'artère est donc un point qu'il sera nécessaire d'élucider et d'éclaircir dans l'élaboration des prochains modèles mathématiques de filtration et l'élaboration de nouvelles expériences de filtration.

4.1.5. Résumé des résultats des modèles de filtration

Malgré les imperfections citées précédemment, les modèles de filtration développés par KARNER et PERKTOLD (2000) et par MANCEAU (2002) à partir des équations et

coefficients développés permettent de déduire certains résultats dans une situation concrète que nous avons tenté de reproduire en laboratoire. Le tableau I résume les coefficients et équations du modèle présenté par MANCEAU (2002). Le tableau II présente les résultats prédits par le modèle de KARNER et PERKTOLD (2000) et de MANCEAU (2002) pour la filtration en situation statique de l'albumine au travers d'une aorte thoracique de lapin jeune et sain avec une pression entre la surface de l'endothélium et la LEE de 50 mmHg.

General Coefficients		
R	8.314 (J/mol-°K)	Universal gas constant
T	310 (K)	Solvent Temperature at 37 °C
Co (concentration)	0.572 (mol/m ³)	Inlet value
Uo (velocity)	0.169 (m/s)	Mean luminal velocity-Reference velocity
Do (diameter)	6.2 10 ⁻³ (m)	Luminal diameter-Reference length
Ti (thickness)	10 10 ⁻⁶ (m)	Intima
Tm (thickness)	300 10 ⁻⁶ (m)	Media
Lumen (Navier-Stokes + albumin transport)		
ρ (blood)	1.100 (kg/m ³)	$\rho(\bar{u} \cdot \nabla)\bar{u} - \nabla \cdot (-pI + \mu(\nabla\bar{u} + \nabla^t\bar{u})) = 0$ $\nabla \cdot \bar{u} = 0$
μ (blood)	3.5 10 ⁻³ (Pa-s)	
K _l	1.0	$K_l \bar{u} \cdot \nabla c - \nabla \cdot (d\nabla c) + k_r c = 0$
d	9.01 10 ⁻¹¹ (m ² /s)	
k _r	0	
Intima (Darcy + albumin transport)		
K _p / μ	1.2151 10 ⁻¹³ (m ² / Pa-s)	$-\nabla \cdot \left(\frac{K_p}{\mu} \nabla p \right) = 0$
K _l	1.12	$K_l \bar{u} \cdot \nabla C - \nabla \cdot (d\nabla C) + k_r C = 0$
D	5.99 10 ⁻¹¹ (m ² /s)	
k _r	0	
Media (Darcy + albumin transport)		
K _p /μ	1.0801 10 ⁻¹⁶ (m ² / Pa-s)	$-\nabla \cdot \left(\frac{K_p}{\mu} \nabla p \right) = 0$
K _l	3.0872	$K_l \bar{u} \cdot \nabla C - \nabla \cdot (d\nabla C) + k_r C = 0$
D	1.48 10 ⁻¹¹ (m ² /s)	
k _r	2.0 10 ⁻⁴ (s ⁻¹)	
IEL (Volume flux & Solute flux equilibrium)		
Lp	3.05 10 ⁻¹⁰ (m/Pa-s)	$\frac{J_v}{S} = Lp (\Delta p - \sigma_d R T \Delta c)$
σ _d	2.13 10 ⁻³	
P	6.37 10 ⁻⁹ (m/s)	$\frac{J_s}{S} = P \Delta c + \frac{J_v}{S} (1 - \sigma_r) \bar{c}$
σ _r	1.94 10 ⁻³	
ENDO (Volume flux & Solute flux equilibrium)		
Lp	3.00 10 ⁻¹² (m/Pa-s)	$\frac{J_v}{S} = Lp (\Delta p - \sigma_d R T \Delta c)$
σ _d	0.75	
P	1.32 10 ⁻⁹ (m/s)	$\frac{J_s}{S} = P \Delta c + \frac{J_v}{S} (1 - \sigma_r) \bar{c}$
σ _r	0.82	

Tableau I – Modèle mathématique présenté par Josée Manceau et André Garon au Printemps 2002.

Domaine	KARNER et PERKTOLD	MANCEAU
	(2000)	(2002)
Endothélium	68 %	82 %
LEI	31 %	17 %
Média	1 %	1 %

Tableau II Contributions prédites des couches à la chute de concentration de l'albumine.

Tableau tiré du mémoire de MANCEAU (2002).

4.2. PROTOCOLES DE FILTRATION

4.2.1. Expérimentations antérieures de filtration au travers des parois artérielles

La distribution endogène de l'albumine au travers des parois artérielles est connue depuis de nombreuses années et a été le mieux déterminée par LONDONO et BENDAYAN (1989), LONDONO et BENDAYAN (1990), LONDONO et BENDAYAN (1992), et LONDONO et al. (1992) à l'aide d'études en microscopie électronique en retrouvant de manière indirecte l'albumine endogène par immunocytochimie à l'aide d'une technique utilisant la protéine A-or. Notons que ces expériences ont été réalisées chez des rats sains sauf dans un cas qui a été réalisée sur

des prélèvements humains lors de chirurgie de remplacement valvulaire (LONDONO et al., 1992). Cette dernière expérience était alors en mesure de donner des informations sommaires sur la distribution endogène de l'albumine dans des conditions saines ou pathologiques. Cette même technique d'immunocytochimie a aussi été utilisée par BENDAYAN pour étudier la distribution de l'albumine endogène dans les parois glomérulaires de rats diabétiques (BENDAYAN et al. 1986) et dans de nombreuses autres conditions que nous aborderons en partie.

Afin de démontrer correctement un modèle mathématique, nous devons être en mesure de construire un modèle de filtration qui utilise les mêmes données que celles utilisées dans le modèle mathématique de filtration de l'albumine. Ainsi, nous devons utiliser l'albumine comme traceur chez le lapin. Nous devons trouver un protocole qui utiliserait l'albumine exogène uniquement puisque uniquement l'albumine nouvellement filtrée nous intéressait.

4.2.1.1. Utilisation de traceurs radioactifs

Pour arriver à mesurer un produit nouvellement filtré, en l'occurrence l'albumine, certains protocoles ont déjà été tentés. Un des premier protocole pour ce faire utilisait la radioactivité et était en mesure de diviser le passage de l'albumine selon la paroi interne, médiane et externe de l'aorte (DUNCAN et al., 1962). Nous avons besoin d'une précision beaucoup plus grande que cette dernière et nous nous sommes tourné vers des expériences plus récentes. Selon le même principe, plusieurs dont TEDGUI et al.

(1992), BELMIN et al. (1993) et MEYER et al. (1996) avaient déterminé la filtration en mesurant l'albumine marquée de manière radioactive dans des solutions homogènes formées à partir de coupes radiales de 10 μm d'aorte de lapin. Une variante de cette technique a aussi été développée en utilisant la microautoradiographie quantitative (FRY, 1983). Le grand désavantage de ces protocoles était que la coupe des tranches au cryostat ne permettait pas de garder la première couche de 5 à 10 μm qui n'était pas d'une épaisseur stable. C'est donc dire que de cette manière, nous n'étions pas en mesure de conserver la coupe correspondant à des régions très intéressantes pour nous, soit l'endothélium, l'intima et la LEI. Nous avons tenté plusieurs expériences de filtration avec des aortes de chiens (35 kg) puis de bœufs (150 kg) afin de tenter de rendre l'épaisseur de la couche perdue peu significative sur l'épaisseur totale de l'artère. Toutefois, la manipulation de très gros spécimens n'était pas sans entraîner des complications en plus du fait qu'avec ces techniques, nous n'étions pas encore en mesure d'analyser le comportement d'une partie importante de l'intima, de l'endothélium et de la CSCE.

4.2.1.2. Utilisation de marqueurs colorés ou fluorescents

Nous avons regardé certains protocoles de filtration d'albumine marquée avec du bleu d'Evans, mais cette dernière alternative a été rejetée rapidement considérant que cette technique nous donnerait strictement des mesures qualitatives et non quantitatives comme nous le souhaitions. La mesure de la filtration par la fluorescence semblait donner davantage de précision que la technique au bleu d'Evans et avait été utilisée de

manière semi-quantitative pour étudier la perméabilité des aortes de rats diabétiques (HOLLIS et al., 1984) et la pénétration de l'albumine dans l'aorte de lapin (FORSTER et WEINBERG, 1997). Toutefois, la méthode avec la fluorescence demeurait une technique davantage qualitative.

4.2.1.3. Décision d'utiliser une technique utilisant l'immunocytochimie

L'immunocytochimie avait l'avantage d'avoir le potentiel d'être quantitative en plus de nous permettre de localiser de manière précise l'albumine exogène filtrée. Nous espérons que cette dernière caractéristique nous permettrait de répondre à certaines hypothèses en rapport au lieu de passage de l'albumine au niveau de l'endothélium et au niveau des cellules musculaires lisses. Ainsi, nous nous sommes inspirés de nombreux protocoles antérieurs utilisant la technique de marquage à l'or pour la microscopie électronique. BENDAYAN (2000), fort d'une expérience importante dans le domaine, a récemment présenté une revue très complète du sujet. Cette revue était une suite aux deux premières revues présentées antérieurement sur le sujet (BENDAYAN, 1984) (BENDAYAN, 1995). Les avancements permis à l'aide de cette technique sont importants et la technique est très versatile. En exemple, BENDAYAN et al. (1996) à l'aide du marquage de l'albumine exogène à l'aide de la protéine A-or ont démontré que le passage de l'albumine au travers de l'endothélium de la rete mirabile semble passer par des vésicules de transport. Le groupe a même été en mesure d'effectuer des mesures quantitatives et de calculer un coefficient de perméabilité pour l'albumine dans ce cas.

4.3. DONNÉES ANTÉRIEURES POUR DÉTERMINER LES PARAMÈTRES DE L'EXPÉRIENCE

4.3.1.1. Importance de la pression artérielle pour la filtration

Nous ne reviendrons pas ici sur les doutes que nous avons déjà exprimés en ce qui a trait au choix de 50 mmHg comme étant la pression utilisée puisqu'elle correspond à la différence de pression entre la lumière et la limite média-adventice utilisée dans les modèles mathématiques. Notons toutefois ici que TEDGUI et al. (1992) ont démontré que la distribution de l'albumine au sein de la média est dépendante de la pression artérielle et que la distribution de l'albumine dans la média variait avec un changement de pression aussi court que 5 minutes. Malheureusement, le protocole expérimental utilisé ne permettait pas d'obtenir des informations concernant les premières couches de l'aorte (endothélium, intima LEI) ou sur la contribution précise des vasa vasorum.

4.3.1.2. Influence de l'état d'étirement du vaisseau étudié

En étudiant les altérations de l'espace extracellulaire par les stress mécaniques sur les aortes de lapins, TEDGUI et LEVER (1987) ont démontré que l'état de repos des artères n'était pas l'état le plus favorable afin de faire l'étude des phénomènes impliquant des volumes de distribution. Il est donc mieux d'utiliser un protocole expérimental qui utilise des artères étirées à la longueur in vivo et avec une pressurisation aux valeurs

physiologiques. Dans le même ordre d'idée, la contribution d'un flot pulsé aurait fort probablement une influence qu'il serait nécessaire de déterminer.

4.3.1.3. Importance de prendre des tissus loin des ostiums des vasa vasorum

Nous nous devons de faire les prélèvements loin des ostiums ou des bifurcations puisque nous savons que la filtration de l'albumine déterminée par une méthode utilisant la fluorescence est différente aux rebords des ostiums (FORSTER et al., 1997). Nous savons aussi que la structure de la LEI est différente au niveau des bifurcations, ce qui pourrait influencer la filtration (GORDON et al., 1981). De plus, le type de flot différent et les forces de cisaillement différentes auxquelles sont soumises les parois des artères près des bifurcations ont sûrement des impacts en ce qui concerne la filtration (KARMAKAR, 2001). Aussi, tel que nous l'avons rapporté dans le chapitre 3, nous pouvons avoir des doutes à savoir la filtration se passe de manière identique entre la paroi postérieure de l'aorte et la paroi antérieure, dans le contexte qu'il est probable que la densité des vasa vasorum en postérieur soit plus grande. De toutes ces raisons réside l'importance d'effectuer les prélèvements pour analyse toujours au même endroit.

4.3.1.4. Temps de filtration utilisé

Le temps optimal afin de terminer l'expérience de filtration a été évalué en premier lieu en se fiant sur les expériences antérieures avec de l'albumine marquée à l'aide de traceurs radioactifs. Bien que différentes, ces expériences étaient ce qui se retrouvait de plus près de l'expérience que nous voulions faire. TEDGUI et LEVER (1985) avaient

déterminé que l'équilibre dans leur épreuve de filtration se retrouvait à environ 90 minutes. De même, les expérimentations de filtration de MEYER et al. (1996) ont été arrêtées à 30 minutes, soit avant que l'équilibre soit atteint. Nous avons fait certaines expérimentations de filtration in vivo et in vitro pour nous rendre compte que le meilleur temps de filtration pour l'expérimentation serait de 30 minutes. Cela, puisque passé 30 minutes, dans le cas des expérimentations in vivo, la filtration commençait à s'estomper, principalement au niveau des couches plus luminales. Ces données ont été démontrées en microscopie à fluorescence (résultats non montrés) et sont probablement secondaires à la diffusion de l'albumine marquée dans les tissus, et donc à la baisse d'albumine marquée dans le plasma. En ce qui a trait aux expérimentations in vitro, le temps de filtration optimal était aussi de 30 minutes pour des raisons techniques afin de garder l'assurance d'avoir une aorte dont la viabilité était intacte.

4.3.1.5. Choix de lapins jeunes et en santé

Nous avons utilisé des lapins jeunes et en santé afin de correspondre aux modèles mathématiques de filtration qui utilisent des lapins jeunes et en santé. Nous pouvons toutefois facilement émettre l'hypothèse que les changements structuraux et physiologiques, induits au niveau des parois artérielles avec l'âge et la maladie, ont une influence sur la filtration des macromolécules. Comme exemple, notons ici les observations de BELMIN et al. (1993) sur des concentrations d'albumine dans la média de l'aorte thoracique de rat. Ces derniers arrivaient aux conclusions que la perméabilité endothéliale doit être plus grande chez le rat plus âgé que chez le rat jeune. Bien que

l'article n'en fasse pas mention, les différences au niveau de la LEI pourraient aussi avoir un rôle à jouer dans ce phénomène.

4.3.2. Protocole de filtration in vivo avec BSA-FITC

4.3.2.1. Rationnelle d'expériences in vivo

Nous avons effectué des protocoles de filtration in vivo sur quelques lapins et un rat. Nous présentons ici le protocole chez les lapins. Nous voulions effectuer des expériences in vivo afin d'étudier à un certain moment dans l'avenir, la filtration d'albumine in vivo dans des conditions normales et à l'occasion de certains états pathophysiologiques, notamment l'endotoxémie.

4.3.2.2. Protocole de filtration in vivo avec BSA-FITC

Des lapins mâles albinos New Zealand (2,7 à 2,9 kg) sont anesthésiés avec du pentobarbital de sodium. Une canule veineuse fémorale est introduite et est reliée à un soluté d'une solution isotonique (NaCl 0,9 %) en perfusion continue à 1,5 ml/min. Une canule artérielle fémorale est aussi introduite pour le suivi de la pression artérielle tout le long de l'expérience. Les prélèvements sanguins seront aussi faits par le biais de cette canule artérielle. L'hématocrite initial est pris à partir d'un tube capillaire hépariné via la canule fémorale. Les prélèvements suivants seront faits : 1,0 ml de sang est retiré au temps -1, 3, 10 et 30 minutes.

Au temps zéro (0), nous injectons via la voie veineuse fémorale 5 ml d'une solution de FITC-BSA dans le NaCl 0,9 % (BSA-FITC 8 mg/ml).

À un temps prédéterminé, généralement 30 minutes, le thorax est ouvert par une section à la ligne médiane du sternum et l'aorte thoracique est exposée après déplacements latéraux des poumons. À ce moment, les lapins sont sacrifiés avec une surdose de Pentobarbital de sodium. Après occlusion de l'aorte thoracique proximale, tout juste après la fin de la crosse aortique, l'aorte est prélevée pour analyses ultérieures et les divers segments sont utilisés selon les protocoles décrits ci-après.

4.3.3. Protocole de filtration in vitro avec BSA-FITC

4.3.3.1. Préparation des tissus

Des lapins mâles albinos New Zealand (2,7 à 2,9 kg) sont sacrifiés par décapitation suite à une anesthésie préalable avec un mélange de Kétamine et de Xylazine.

Le thorax est ouvert par une section à la ligne médiane du sternum et l'aorte thoracique est exposée après déplacement latéral des poumons. Pendant toute la durée de la procédure, une solution de Krebs à 37°C oxygénée est appliquée sur l'aorte afin de prévenir la déshydratation.

L'aorte thoracique est ouverte d'une légère incision proximale tout juste après l'arc aortique et est ensuite canulée avec un cathéter nasogastrique utilisé en clinique de 12F. L'aorte est attachée solidement à ce cathéter à l'aide de fils de soie. L'aorte est alors perfusée avec une solution de Krebs, oxygénée et maintenue à 37°C avec un pH de 7,4.

Par la suite, l'aorte thoracique descendante est canulée en distal avec un autre cathéter de Levine pour y être aussi attaché avec des fils de soie. Ce deuxième cathéter est relié à la même solution de Krebs que le cathéter proximal et nous effectuons une perfusion de la solution de Krebs pendant que la séparation de l'aorte des tissus environnants est complétée.

L'aorte est alors prélevée tout en tentant de maintenir la longueur in vivo de l'artère. L'aorte est ensuite transférée dans un bain de Krebs maintenu à 37°C et oxygéné. La préparation de l'aorte est complétée en ligaturant les intercostales qui avaient été inaccessibles jusqu'à ce moment et en s'assurant que le montage soit étanche et ne laisse pas de place pour les fuites. L'aorte est ensuite soumise à une période d'équilibration de 30 à 60 minutes où elle est laissée dans le bain de Krebs. Pendant cette période d'équilibration, l'intérieur de l'aorte est perfusée par une solution de Krebs (37°C et oxygéné) à l'aide d'une pompe péristaltique avec un étranglement au niveau de la tubulure à la sortie de l'aorte donnant une pression de 50 mmHg à l'intérieur de l'aorte. En plus de permettre au tissu de se stabiliser suite au choc important qu'il vient de recevoir, la période d'équilibration nous permet de vérifier l'étanchéité du montage.

4.3.3.2. *Épreuve de filtration*

L'objectif du montage est de pressuriser l'intérieur et l'extérieur de l'aorte de lapin et d'effectuer des épreuves de filtration dans une condition statique.

À l'aide d'un système de robinets, la solution de Krebs baignant l'intérieur de l'aorte est remplacée par une solution constituée de FITC-BSA (généralement 0,2 mg/ml) diluée dans le Krebs. La solution dans laquelle baigne l'extérieur de l'aorte demeure la solution de Krebs pure. Les solutions auxquelles sont exposées l'intérieur et l'extérieur de l'aorte sont oxygénées et maintenues à 38°C.

Le système de robinet est une ligne de robinets reliés entre eux. Un des robinets est relié à un tube monté de manière verticale et pouvant contenir une colonne de liquide. Un autre robinet est relié à un manomètre électronique et finalement un dernier robinet est relié à l'aorte. En maintenant tous les robinets ouverts, les différents systèmes sont en communication et il est alors possible de maintenir une pression différentielle entre l'intérieur et l'extérieur de l'aorte à 50 mmHg à l'aide d'une colonne de liquide qui correspond à cette pression. Cette différentielle est validée à l'aide du manomètre électronique dont les sondes de pression sont placées à la hauteur de l'aorte.

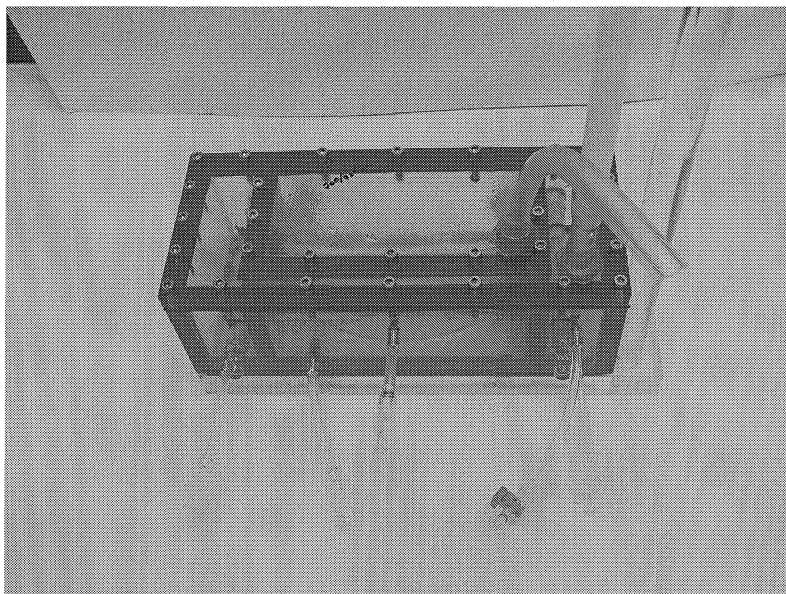


Figure 31 *Premier montage pour la filtration construit à l'école polytechnique de Montréal*

Avec ce montage, les temps pour pressuriser et dépressuriser l'aorte étaient toutefois trop longs. Nous nous sommes alors penchés vers d'autres méthodes plus efficaces et plus simples tels que le système de robinet présenté dans le texte.

La période allouée pour la filtration du FITC-BSA est généralement de 30 minutes. Immédiatement à la fin de cette période, pendant que l'aorte thoracique baigne encore dans une solution de Krebs avec FITC-BSA, nous remplaçons cette solution par une solution constituée de Glutaraldéhyde 0,5 % *p*-parafolmaldéhydes 2,5 % dans PBS 0,1 M. Nous ajustons ensuite le niveau de la colonne de liquide afin d'effectuer une fixation pendant 10 minutes avec une pression interne de 50 mmHg. À la fin de cette période, nous retirons l'aorte du bain pour la diviser en divers segments pour analyses

ultérieures. Les divers segments sont utilisés, entre autres, à l'intérieur des protocoles décrits ci-après ou bien dans ceux décrits dans le chapitre 3. À noter que les segments conservés sont uniquement ceux ne démontrant pas de fuite de FITC, soit une couleur orange à l'œil nu.

4.4. PROTOCOLES D'OBSERVATION

4.4.1. Observation en microscopie à fluorescence

Une section de l'aorte thoracique est montée en anneau dans une résine (Tissue-Tek O.C.T. Compound) et congelée afin d'être coupée ultérieurement au cryostat (14 μm). Les coupes sont ensuite placées sur des lames de microscopie.

Les lames sont alors examinées en microscopie à fluorescence avec un microscope LEITZ DM RBE et les images sont numérisées à l'aide d'une caméra KODAK MDS 120. Il est à noter que la photographie présentée comme échantillon dans ce mémoire a été prise avec un microscope Axioskop 2 (ZEISS) appareillé d'un système pour microscopie à fluorescence et contraste de phase de SPOT Diagnostic Instruments Inc. Les images ont été acquises avec le logiciel SPOT V 1.2.1.

Tout cela, avec l'objectif de mettre en évidence le FITC et donc l'albumine exogène. La présence de FITC dans les couches de l'aorte est une condition afin de pouvoir poursuivre l'expérimentation avec l'immunocytochimie.

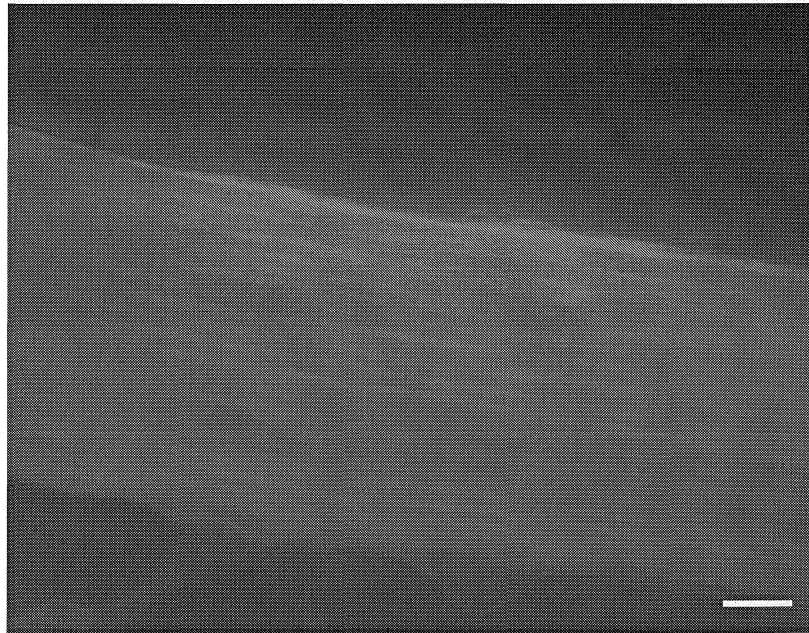


Figure 32 *Filtration de l'albumine en microscopie à fluorescence.* Microscopie à fluorescence de l'aorte de lapin fixée in vitro à 50 mmHg suite à la perfusion statique de FITC-BSA pendant 30 minutes à 50 mmHg (tirez 20 μm). L'endothélium est situé vers le haut. Nous remarquons la distribution en V de l'albumine marquée et nouvellement filtrée.

4.4.2. Protocole de fixation et de préparation des tissus pour immunocytochimie

4.4.2.1. Choix du protocole de fixation

La fixation des tissus d'une manière adéquate revêt une importance majeure pour l'obtention d'un marquage adéquat. Nous nous sommes inspirés de techniques déjà développées (BENDAYAN et al., 1987) et présentées, mais malgré cela, plusieurs essais et erreurs ont été et sont encore nécessaires afin d'obtenir une fixation adéquate qui nous permettrait d'obtenir un marquage adéquat des tissus étudiés.

Nous avons besoin d'un protocole qui nous permettrait de conserver assez de propriétés de l'hapten utilisé (FITC) pour que les anticorps utilisés dirigés contre l'hapten soient en mesure de le reconnaître et de s'y fixer. Nous avons tenté plusieurs protocoles de fixation en parallèle et à de nombreuses reprises pour conclure qu'une fixation prolongée des tissus, soit de plus de quelques heures, résultait en une altération trop grande de la structure du FITC et de ses sites antigéniques. Il en était de même pour l'utilisation d'un fixateur qui contenait une concentration de glutaraldéhyde trop importante.

Le fixateur utilisé devait aussi contenir une concentration assez importante d'aldéhydes afin d'être assurée que le tissu soit fixé et qu'il n'y ait plus migration de l'albumine marquée une fois la fixation débutée. De plus, un tissu mal fixé ne nous permet pas de visualiser de manière correcte les structures en microscopie électronique en plus

d'entraîner des artefacts lors du protocole de localisation de l'hapten en immunocytochimie. Un mélange de glutaraldéhyde et de *p*-paraformaldéhyde, a donc été utilisé et plusieurs concentrations différentes ont été évaluées.

4.4.2.2. *Choix d'un milieu de montage (résine)*

Tout comme le choix du fixateur, le choix d'un milieu de support (résine) est important afin de conserver les caractéristiques du tissu observé (BENDAYAN et al., 1987). GHITESCU et BENDAYAN (1992) ont réalisé des manipulations très semblables à celles que nous envisagions et ont démontré que l'EPON était une résine offrant davantage de marquage que le Lowicryl. Ces derniers ne traitaient toutefois pas du cas du LR White que nous avons aussi tenté à l'occasion de notre protocole.

Nous avons utilisé les résines suivantes : Lowicryl (London Resin Company Ltd, Berkshire (Angleterre), LR White et EPON 812 (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.). Dans le cas de l'EPON, nous avons la possibilité d'ajouter une incubation avec du tetroxide d'osmium 1% (FISHER Scientific, NJ, É.-U.) ou non. Nous avons procédé à des expériences en parallèle afin de tester la meilleure combinaison de fixateurs. Nous étions toutefois en mesure de nous guider sur les résultats de GHITESCU et BENDAYAN (1992) à l'effet que bien que le tetroxide d'osmium améliore les contrastes, ce dernier diminue toutefois la quantité de marquage de moitié. Aussi, dans le cas précis du BSA-FITC, la fixation à L'EPON a été plus

avantageuse que le Lowicryl dans des expériences d'immunocytochimie pour le groupe de GHITESCU et BENDAYAN (1992).

Pour terminer, une autre caractéristique importante du protocole de fixation que nous voulions obtenir était la préservation de l'architecture morphologique des tissus. Cela a été possible avec tous les mélanges de fixateurs utilisés et avec toutes les résines utilisées.

4.4.2.3. Fixation des tissus utilisés pour l'immunocytochimie dans le présent protocole

À la fin du protocole de filtration de FITC-BSA, à l'aide du système de robinets, nous avons remplacé la solution contenant le FITC-BSA et qui baignait l'intérieur de l'aorte par une solution de p-paraformaldéhyde 2,5 % et Glutaraldéhyde 0,5 % (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.) dans 0,1 mol/L PBS à pH 7,4. La pression différentielle statique a été réajustée pour 10 minutes avec une différence entre l'intérieur et l'extérieur de l'artère de 50 mmHg. La solution du bain de Krebs a aussi été changée par une solution de p-paraformaldéhyde 2,5 % et Glutaraldéhyde 0,5 % dans 0,1 mol/L PBS à pH 7,4. Suite à la période de 10 minutes, l'aorte est démontée et l'aorte thoracique est coupée en morceaux de 1 mm² en prenant soins de ne pas abîmer les structures. La fixation est poursuivie dans le même fixateur pendant au moins deux heures à température ambiante.

Nous allons décrire ci-après uniquement le procédé utilisant l'EPON comme résine. Les morceaux maintenant fixés sont ensuite lavés avec une solution de PBS 0,1 M pour ensuite être incubé dans le Tetroxide d'osmium 1% pendant 60 minutes. Les sections sont ensuite déshydratées avec des concentrations progressives d'éthanol et ensuite fixées dans l'EPON. Les sections sont alors coupées en minces tranches selon la direction radiale en se fiant sur la courbure encore présente des sections d'aorte. Ces tranches sont ensuite montées sur des grilles de Nickel. Des coupes semi-fines en provenance de ces sections d'aorte sont passées dans une coloration de toluidine afin de faire une évaluation générale de la morphologie des coupes.

4.4.3. Immunocytochimie

4.4.3.1. Choix de l'antigène primaire

Nous reprenons ici les arguments qui nous ont fait choisir le FITC comme haptène de l'albumine pour les expériences de filtration.

Le premier produit de marquage envisagé a été l'albumine bovine marquée au dinitrophénol (DNP-BSA) comme utilisée antérieurement par LONDONO et al. (1995) et par GHITESCU et al. (1992) afin d'étudier les glomérules rénaux. Cette méthode ne fut toutefois pas retenue. La conjugaison n'était pas facilement envisageable dans notre laboratoire et en plus, nous n'aurions pas été en mesure de vérifier lors d'étapes intermédiaires en fluorescence que l'albumine exogène soit réellement présente. De

plus, le fait de ne pas retrouver d'albumine en microscopie électronique ne nous indiquait pas si c'était qu'elle n'était pas présente ou bien si c'était un des anticorps, la liaison de l'or, ou une autre étape qui était fautive. Nous avons donc regardé pour d'autres produits de marquage. Les produits avec fluorescence nous intéressaient particulièrement considérant que nous pouvions observer les tissus immédiatement après l'expérience en microscopie à fluorescence avant d'effectuer le protocole d'immunocytochimie et ainsi confirmer le passage de l'albumine. BRUNEAU et al. (2003) avaient récemment utilisé le FITC comme marqueur des lipases dépendantes des sels biliaires et BENDAYAN et LONDONO (1996) avaient utilisé le FITC-BSA pour des protocoles au niveau des reins.

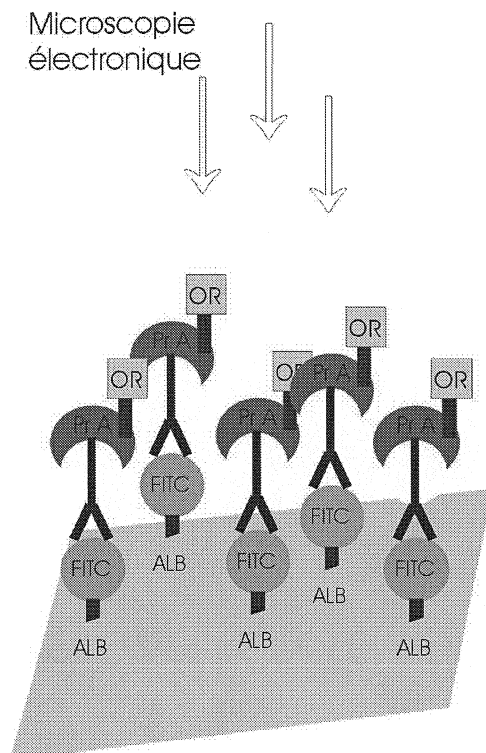


Figure 33 *Principe de l'expérience en immunocytochimie*
 Le FITC-BSA dans le tissu est lié par un anticorps spécifique au FITC. Les anticorps sont ensuite mis en évidence par les complexes de protéine A-or.

En ce qui a trait aux anticorps dirigés contre le FITC, nous avons essayé un anticorps provenant de souris (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) et un en provenance de lapin (Dakopatts, Danemark).

En ce qui a trait à la liaison des protéines sur les anticorps, en se fiant sur les fiches signalétiques des guides de la compagnie Sigma, nous avons l'information que lors d'essais en immunocytochimie, la protéine G-or (Cederlane, Hornby, ON, Canada) se liait un peu mieux que la protéine A-or (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) en ce qui a trait aux anticorps produits chez les souris. Dans le cas des anticorps produits chez les lapins, les protéines A et G présentaient une liaison adéquate dans les deux cas.

Dans ce cas encore, nous avons fait de nombreux essais en parallèle afin de déterminer la combinaison la plus profitable en ce qui a trait aux anticorps, protéines, temps d'incubation et concentrations à utiliser.

4.4.3.2. Protocole d'immunocytochimie utilisé dans la présente expérience

Les tissus étudiés sont réhydratés dans l'eau distillée pendant 5 minutes et ensuite placés dans une solution tamponnée de phosphate (PBS) pendant aussi 5 minutes. Les tissus sont ensuite trempés pour 30 minutes dans une solution de glycine 0,150 mol/L dans le PBS avant d'être rincés trois fois dans le PBS et trempés dans une solution d'ovalbumine 1% dans le PBS pour un autre 30 minutes.

Les grilles sont ensuite incubées (généralement pour 120 minutes) avec une goutte d'anti-FITC (dilution entre 1 : 25 et 1 : 200) de lapin pour ensuite être rincés trois fois dans le PBS et encore trempées dans une solution d'ovalbumine 1% dans le PBS pour un autre 60 minutes.

Ainsi, les grilles sont ensuite incubées pour 30 minutes sur une goutte de Protéine A-or (grosseur moyenne des particules 10 nm, $OD_{520}=0,5$). Les grilles sont ensuite lavées avec du PBS puis de l'eau distillée pour être ensuite colorées avec des colorations d'acétate d'uranyl 5% (Electron Microscopy Sciences, Washington, É.-U.) et de citrate de plomb.

4.4.4. Observation en microscopie électronique

Les grilles ont été observées sur un microscope électronique HITACHI H7500 et les images ont été numérisées à l'aide d'une caméra numérique KODAK MEGAPLUS Camera Model 1,6 pour être ensuite traitées avec le logiciel A.M.T. V 2.25.5.



Figure 34 *Faux espoirs !*

Segment d'aorte de lapin fixée suite à une perfusion in vivo de FITC-BSA pendant 150 minutes, fixé par la suite avec des aldéhydes et placé sur des grilles pour protocole subséquent en immunocytochimie. Le marquage important que nous obtenons est principalement secondaire au fait que le tissu est

endommagé et n'est pas spécifique pour le FITC comme nous le souhaitions. Les images longilignes au-dessus de l'endothélium sont probablement en partie des protéoglycans de l'intima se retrouvant à cet endroit, secondairement à la perte d'intégrité de l'endothélium, et des fragments de cellules endothéliales.



Figure 35 *Marquage sans spécificité au niveau du système vésiculo-tubulaire des cellules endothéliales*

Effectivement, nous retrouvons aussi un marquage du noyau et les contrôles de spécificité sont perturbés.



Figure 36 *Marquage spécifique de FITC-BSA au niveau de l'interstice de la média et des cellules musculaires lisses*

Segment d'aorte de lapin fixée suite à une perfusion in vivo de FITC-BSA pendant 15 minutes, fixé par la suite avec paraformaldéhyde 2,5 %, Glutaraldéhyde 0,5 % dans PBS à pH 7,4 et enrobé dans l'EPON. Les échantillons ont été placés sur des grilles pour protocole subséquent en immunocytochimie,

en l'occurrence une concentration d'un anticorps fait chez la souris à 1:25 incubé pendant une nuit puis protéine A-Or 1:20 pendant 30 minutes. Le cytoplasme des cellules musculaires lisses est marqué ainsi que l'interstice. L'élastine est libre de marquage. Le contrôle sans anticorps ne montre pas de marquage.

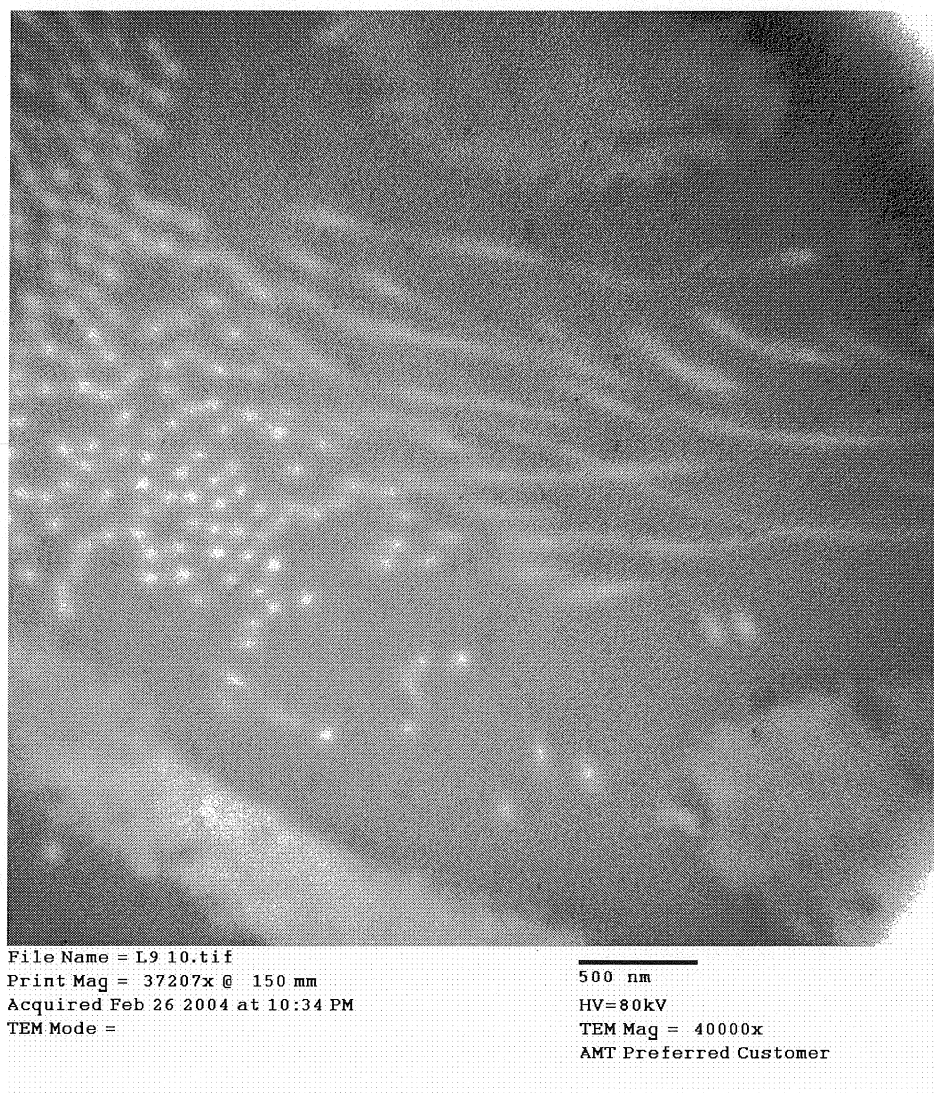


Figure 37 *Marquage spécifique de FITC-BSA au niveau du collagène et de l'interstice de la média – in vivo*

Image provenant du même segment d'aorte et ayant été préparé de manière identique que pour la figure précédente.

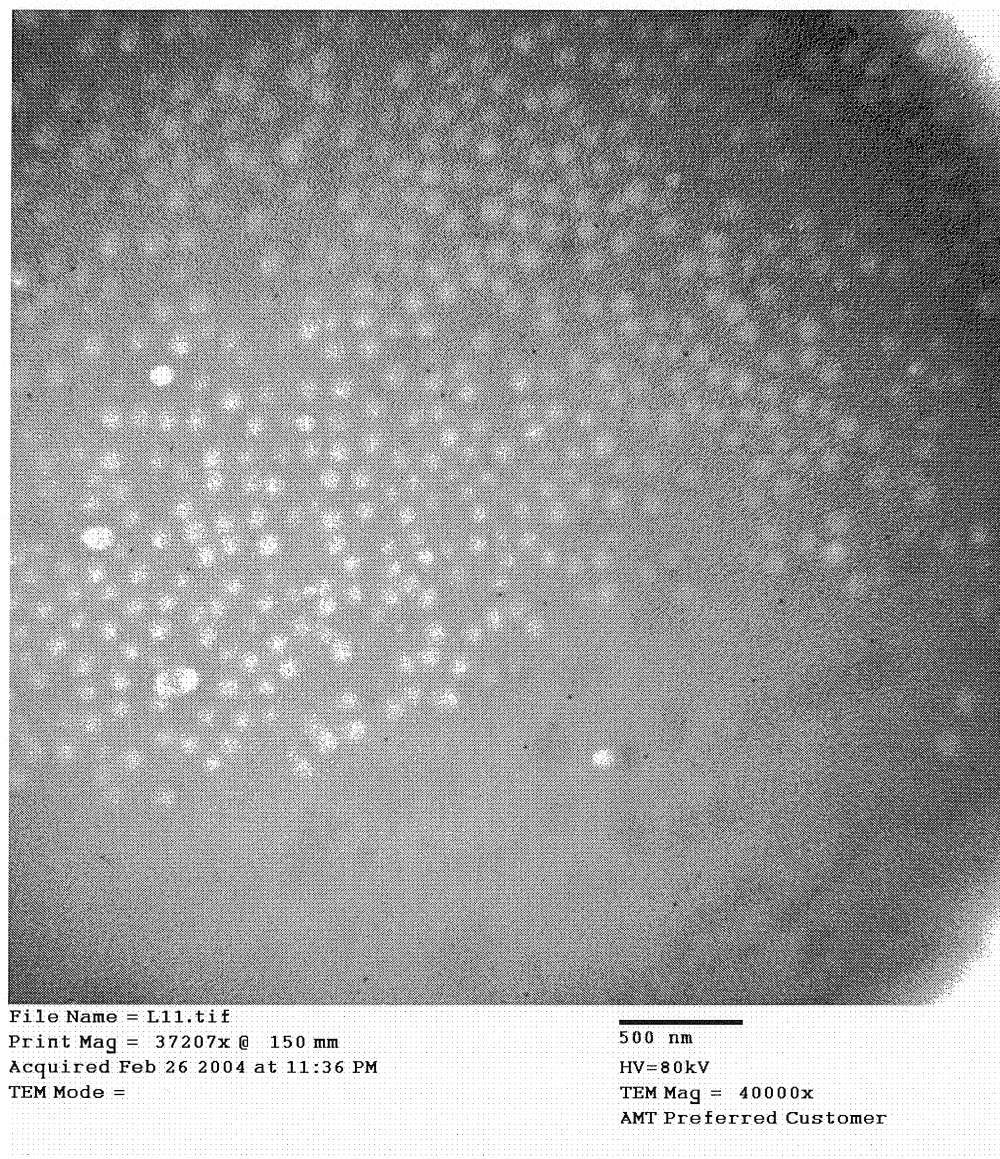


Figure 38 *Marquage spécifique de FITC-BSA au niveau du collagène et de l'interstice de la média – in vitro*

Segment d'aorte de lapin fixée suite à une perfusion in vitro de FITC-BSA pendant 30 minutes à une pression interne de 50 mmHg, fixé par la suite avec paraformaldéhyde 2,5 %, Glutaraldéhyde 0,5 % dans PBS à pH 7,4 et enrobé dans le LR

White. Les échantillons ont été placés sur des grilles pour protocole subséquent en immunocytochimie, en l'occurrence une concentration d'un anticorps fait chez le lapin à 1:25 incubé pendant 2 heures puis protéine A-Or 1:20 pendant 30 minutes.

4.5. ÉTUDE DE VIABILITÉ DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES ET DE L'ENDOTHÉLIUM

Il est fréquent d'avoir besoin de démontrer la viabilité et l'intégrité des tissus qui sont utilisés pour les expérimentations. Plusieurs méthodes sont disponibles et ont été utilisées par le passé en plus de l'intégrité morphologique du tissu en microscopie. Certaines de ces techniques sont présentées dans KENAKIN (1997).

En ce qui a trait aux études utilisant des tissus vasculaires, par le passé, l'intégrité des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle a fréquemment été confirmée en utilisant la vasoconstriction vasculaire comme marqueur de viabilité. Il y a aussi certains essais disponibles pour confirmer la préservation de la réactivité des cellules endothéliales. Ces essais utilisaient plusieurs vasopresseurs, comme l'angiotensine II (TEDGUI et LEVER, 1985) ou des vasorelaxants. Aussi, certains auteurs ont utilisé une méthode histoenzymatique afin de déterminer la viabilité des cellules musculaires lisses (CURMI et al, 1990) en plus de vérifier la préservation de l'intégrité structurale de la paroi vasculaire en microscopie électronique.

Nous avons décidé d'utiliser la réactivité vasculaire comme moyen de tester si les aortes que nous utilisions étaient vivantes et réagissaient normalement à la fin du protocole expérimental auquel ces dernières étaient soumises. De plus, une deuxième confirmation était faite lors de l'observation en microscopie électronique lorsque nous validions la présence et l'intégrité de chacune des composantes de l'aorte.

4.5.1.1. Protocole pour mesurer la réactivité vasculaire

Sept aortes utilisées pour les expériences in vitro de filtration ont été testées afin de valider si les composantes vivantes étaient réactives à la fin du protocole expérimental de filtration. Nous avons donc recueilli soit des aortes qui étaient laissées libres dans le bain de Krebs durant toute la durée du protocole de filtration, soit des aortes montées sur des tubes nasogastriques en série avec le segment d'aorte soumis à la filtration de BSA-FITC. Dans le cas des aortes montées, nous avons placé les segments d'aorte de manière intercalés et en série pour que l'intérieur du segment d'aorte testé en réactivité soit soumis aux mêmes conditions que le segment d'aorte destiné à être fixé et analysé en immunocytochimie. Le tube afin d'intercaler les deux segments nous permet d'isoler le segment destiné à la réactivité vasculaire du segment qui sera fixé par des Aldéhydes en fin de protocole. Le segment exposé aux aldéhydes étant bien entendu tué sur le coup.

La graisse de l'extérieur des aortes a été retirée et ces dernières ont été montées en anneaux sur des montages prévus à l'effet de tester si ces dernières réagissent de

manière normale. Nous avons testé la réaction des aortes à l'ajout de KCl, de phényléphrine et d'acétylcholine.

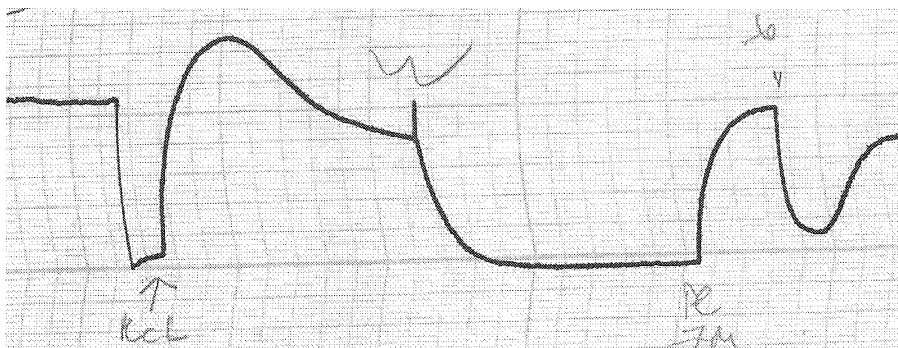


Figure 39 Courbe de réactivité vasculaire d'une aorte thoracique. Démonstration de la viabilité des cellules musculaires lisses par une contraction (vers le haut) suite à l'ajout de KCl dans le bain où se trouve l'aorte. La deuxième courbe représente la contraction suite à la stimulation à la phényléphrine et la relaxation subséquente suite à l'ajout d'acétylcholine.

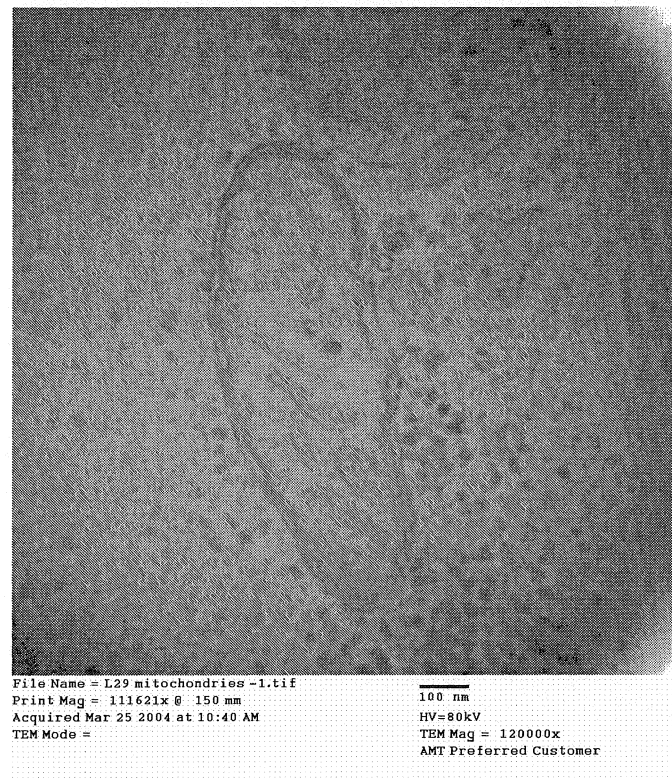


Figure 40 *Mitochondries de l'aorte de lapin à la fin du protocole de filtration in vitro.*
 Microscopie à transmission.

4.5.2. Discussion

Nous n'avons pas testé la réactivité de tous les tissus considérant que les 7 aortes testées pour la réactivité vasculaire ont réagi de manière normale à toutes les infusions. De plus, certaines aortes ayant eu des réponses normales en réactivité avaient des altérations morphologiques en microscopie électronique. Cela, probablement secondairement au fait que la réactivité évalue la réponse globale d'un segment de manière grossière et que certaines anomalies locales ne feront pas changer la réactivité globale du tissu. Aussi, tel que présenté, les mitochondries sont encore présentes à la fin du protocole de filtration,

cela, malgré une courte fixation à l'occasion des expériences d'immunocytochimie. Ainsi, nous avons ensuite utilisé la présence de mitochondries afin de valider la viabilité des tissus et la fixation des tissus. À noter que nous savons que lors de dysfonctionnements cellulaires, certaines altérations, notamment le cytochrome C, sont présentes avant l'apparition d'altérations morphologiques des mitochondries et d'altérations de fonctions.

4.6. DISCUSSION

4.6.1. Causes d'erreur avec le protocole actuelle

Bien que très intéressante, la méthode développée laisse place à certaines critiques et causes d'erreurs. Les plus évidentes sont énumérées ici et nous sommes en mesure d'apporter une correction à certaines d'entre elles.

4.6.1.1. Utilisation de l'albumine bovine chez le lapin

Nous avons utilisé à l'occasion de notre étude de l'albumine bovine. Nous avons fait l'hypothèse que la filtration de cette dernière est relativement semblable à la filtration de l'albumine de l'espèce sur lesquels les vaisseaux ont été prélevés, soit le lapin. Nous ne croyons pas que cette entorse soit source d'une grande marge d'erreur si nous considérons uniquement la filtration en tant que telle. Toutefois, il est possible que si nous voulions évaluer adéquatement le comportement des cellules musculaires lisses au

regard de l'albumine, il serait nécessaire d'utiliser une albumine de la même espèce que celle où les vaisseaux ont été prélevés. Cela, dans le contexte où les cellules musculaires lisses ont fort probablement à reconnaître l'albumine avant d'effectuer une influence, s'il y a, sur la filtration.

4.6.1.2. Concentration d'albumine utilisée

La concentration d'albumine dans le plasma est habituellement de l'ordre d'environ 30 à 40 g/l. Les expériences décrites précédemment utilisaient une concentration d'albumine inférieure à la valeur habituelle dans le plasma. Est-ce que nous aurions eu des avantages à ajuster la concentration à laquelle est exposée l'intérieur de l'aorte pour avoir une concentration d'albumine s'approchant de la concentration normale dans le plasma ? Nous aurions alors conservé environ la même quantité d'albumine marquée et complétée jusqu'à la concentration voulue d'albumine avec de l'albumine qui ne serait pas marquée.

4.6.1.3. Effet de l'ajout du FITC comme haptén

Le FITC est une molécule très fréquemment utilisée dans le contexte de la recherche fondamentale. Considérant que l'ajout de quelques molécules de FITC à l'albumine change très peu les propriétés physiques en comparaison de la molécule native, plusieurs expériences de filtration, dont celles exécutées par PIETRA et LEWIS (1996), celles de McNAMEE (1982), ainsi que celles de BENDAYAN et LONDONO (1996) utilisent le FITC comme haptén.

Toutefois, nous savons que les haptens rendent l'albumine légèrement plus anionique et légèrement plus lourde (GHITESCU et BENDAYAN, 1992). De plus, nous savons que l'effet de changer la charge du produit que nous voulons filtrer peut avoir une influence sur la filtration comme cela a été démontré pour le glomérule (GHITESCU et al., 1992) et suggéré pour l'endothélium pulmonaire (PIETRA et LEWIS, 1996). De même, il a été démontré que la filtration de l'albumine ne se déroulait pas uniquement selon sa masse et sa grosseur, mais aussi selon d'autres propriétés de la molécule filtrée, comme fort probablement sa charge (BALDWIN et al, 2003). Toutefois, LONDONO et al. (1995) ont démontré que le marquage par un haptén (DNP dans ce cas) ne modifiait pas la distribution de l'albumine au niveau des glomérules rénaux lorsque comparée à l'albumine native. De plus, GHITESCU et BENDAYAN (1992) ont démontré que l'albumine conservait sa capacité de transporter les acides gras malgré la présence de FITC.

4.6.1.4. Liaison du FITC avec l'albumine

Aussi, il est nécessaire de préciser qu'il reste une certaine partie de FITC qui n'est pas conjuguée à l'albumine dans le produit fourni par la Compagnie Sigma-Aldrich Fine Chemicals (St-Louis, Missouri, USA). Selon l'évaluation du service de production de Sigma-Aldrich, suite à la conjugaison du FITC et du BSA et à la Chromatographie sur Séphadex afin d'isoler les molécules FITC qui ne sont pas liées sur une molécule de BSA, le produit ainsi obtenu contient 96,3 % de FITC lié au BSA. C'est donc dire qu'il

reste aussi 3,7 % de FITC susceptible d'être libre. Ce problème n'a pas été soulevé par les auteurs qui ont utilisé des substances liées dans le passé, mais il est possible que la petite portion de FITC libre soit en mesure d'induire une erreur parce que cette dernière peut aussi être filtrée. Cette erreur peut être d'autant plus importante que la fluoresceine isothiocyanate est une molécule beaucoup plus petite que l'albumine et peut donc filtrer beaucoup plus facilement au travers d'une paroi. Nous pourrions corriger une partie de l'erreur en effectuant une deuxième chromatographie afin de purifier davantage le produit que nous voulons isoler, soit le BSA-FITC sans FITC libre.

La liaison entre le FITC et le BSA est une liaison covalente, ce qui rend ce produit très stable, même en circulation (GHITESCU et BENDAYAN, 1992).

4.6.1.5. Effet d'une dépressurisation de l'aorte.

Plusieurs expérimentations publiées antérieurement afin d'explorer certains aspects de la filtration au travers de la paroi aortique ont utilisé des techniques visant à maintenir l'aorte pressurisée tout au cours de l'expérience. Mentionnons entre autres : TEDGUI et LEVER (1987) TEDGUI et LEVER (1985) MEYER et al. (1996). Ces derniers ont été dans l'obligation d'effectuer la ligature des intercostales avant le prélèvement. Pour ce faire, il leur était nécessaire d'intuber la trachée le lapin et d'instaurer une ventilation mécanique pour que le lapin puisse survivre suite à l'ouverture du thorax. La technique visant à ligaturer les intercostales nécessite bien souvent l'utilisation de pinces à cautériser qui ne nous étaient pas disponibles. L'objectif de ne pas dépressuriser l'aorte

était de ne pas entraîner de lésion de l'endothélium. De notre côté, nous avons opté pour dépressuriser l'aorte un court instant et ensuite laisser à l'aorte une période d'équilibration. Pendant cette période, l'aorte était perfusée à l'aide d'une pompe péristaltique avec une pression interne de 50 mmHg maintenue à l'aide d'un goulet d'étranglement. La validation que nos goulets délivraient effectivement une pression moyenne de 50 mmHg fut faite à l'aide d'un moniteur de pression ou bien d'un manomètre électronique.

4.6.1.6. Effet d'une exposition statique sans pulsation

Toute la préparation des artères est faite avec un flot pulsé y compris la période d'équilibration. Toutefois, l'exposition au FITC-BSA est statique pendant 30 minutes. Cette période de temps n'est probablement pas assez importante afin que des changements importants aient eu lieu au sein des cellules endothéliales. Toutefois, il est nécessaire de préciser qu'il est bien démontré que les cellules endothéliales s'orientent selon la direction du flot, qu'il soit laminaire ou pulsé (KAMM, 2002). De plus, les cellules endothéliales, exposées à un flot continu au contraire de pulsé, démontrent une réorganisation probable du cytosquelette et une redistribution de la cadherin vers les contacts intercellulaires (PLANT et LEACH, 2002). Ces changements sont présents à 48 heures, ce qui est beaucoup plus que le temps de notre expérience. Pourtant, cela pourrait avoir des impacts dans la conception des pompes axiales tel que nous le discuterons dans le chapitre 6.

4.6.1.7. Effet de l'absence d'albumine dans la solution externe de l'aorte

Au cours de nos expériences, l'extérieur de l'aorte baigne dans une solution de Krebs sans albumine. La littérature est relativement muette à ce sujet, mais il se pourrait que l'albumine présente à l'extérieur des artères puisse avoir une influence sur sa propre filtration. Effectivement, l'albumine pourrait avoir des sites de liaison de prédilection tel que les protéoglycans et le collagène de l'adventice. Ainsi, la présence d'albumine à l'extérieur de l'aorte aurait pour effet de limiter sa propre filtration. Nous avons décrit une situation semblable précédemment en discutant de l'influence de la présence de la CSCE ainsi que de l'espace d'exclusion de l'albumine.

4.6.1.8. Présence de la couche de surface des cellules endothéliales (CSCE)

Comme nous l'avons précisé précédemment, la CSCE a fort probablement une importance majeure en ce qui a trait à la filtration des macromolécules. Ainsi, comme nous l'avons déjà expliqué, confirmer la présence de la CSCE dans le cadre des expériences de filtration est important. Nous nous attardons davantage à ce problème dans le chapitre 3. À noter que nous savons que les protocoles de fixations de la couche des cellules endothéliales ne sont en mesure de retrouver qu'une partie de cette couche. Cela, puisque les protéoglycans et les molécules qui ne sont pas liés de manière directe aux cellules endothéliales sont perdus au cours de la fixation. Les expériences antérieures de filtration in vitro utilisant des traceurs marqués ne tenaient pas compte de la présence de la CSCE lors de la prise de résultats.

4.6.2. Suite à prévoir à ces expérimentations

Bien que nous ayons mené de nombreuses expérimentations de filtration et que les résultats sont prometteurs d'avenir, des ajustements sont encore nécessaires au protocole de filtration, au protocole de fixation, au protocole d'immunocytochimie et au contrôles de spécificités avant que nous soyons en mesure de faire une série d'expériences dans des conditions identiques et être ensuite en mesure d'émettre des statistiques et des conclusions sur la distribution de l'albumine exogène lors de sa filtration. De plus, avant d'effectuer ces séries d'expériences, nous pensons devoir modifier prochainement certains paramètres du protocole général afin de tenir compte de certains changements à prévoir dans les modèles de filtration, notamment en ce qui concerne la pression interne utilisée. Toutefois, certaines applications futures peuvent être décrites.

4.6.2.1. Étude de filtration de d'autres protéines marquées

La technique que nous utilisons est très intéressante du fait que cette dernière est très versatile et qu'elle peut être utilisée avec d'autres produits immunogènes eux-mêmes ou bien marqués à d'autres haptens. Nous pouvons penser par exemple à suivre les LDL. Comme il l'a été démontré par CURMI et al., (1990), ces dernières s'accumulent de manière très importante dans les premières couches de la paroi artérielle contrairement à l'albumine qui se distribue davantage au travers de la paroi. De plus, les LDL sont davantage emprisonnées que l'albumine lorsque l'artère est exposée à une solution de lavage. Ces comportements nécessitent une étude davantage approfondie avant d'être inclus dans un modèle quelconque.

4.6.2.2. Étude de certaines conditions où la perméabilité est modifiée

Nous pensons effectuer des expériences de filtration au niveau de d'autres organes et dans d'autres états pathophysiologiques. Effectivement, de nombreuses conditions pathologiques sont en lien avec des changements de perméabilité, soit concernant seulement un organe, soit au niveau systémique. Nous pouvons penser ici au sepsis, aux réactions anaphylactiques et à certains syndromes inflammatoires et immunologiques. Plusieurs des ces syndromes sont actuellement décrits de manière incomplète en ce qui concerne la perméabilité et plusieurs organes sont peu ou pas étudiés en ce qui a trait à la perméabilité (exemple : le cerveau en situation septique).

4.6.2.3. Distribution de médicaments dans le flot artériel

Les modèles développés nous aident déjà dans de nombreux aspects de la pratique clinique dans plusieurs domaines dont en médecine vasculaire. Par exemple, à l'aide de la méthode des éléments finis, nous sommes en mesure d'améliorer la conception des tuteurs intracoronariens et ainsi tenter d'obtenir une meilleure expansion et une meilleure intégralité avec la paroi vasculaire (MIGLIAVACCA, F. et al., 2002). Toujours avec l'objectif d'étudier les sténoses vasculaires et les altérations de flots et de structures suite à la mise en place d'un tuteur intracoronarien, des modèles très acceptables ont été développés afin de décrire le flot dans les coronaires avec ou sans tuteur (MOORE et BERRY, 2003). Nous avons même une modélisation du flot à l'intérieur d'un pontage vasculaire. Cette dernière a été produite en utilisant la méthode

des éléments finis afin de développer un modèle qui s'est révélé être une simulation acceptable de la réalité lorsque comparé au modèle in vivo d'une greffe vasculaire aortique-aortique contournant une ligature volontaire d'une aorte porcine (STEELE et al., 2003).

Nous pensons qu'il serait intéressant d'utiliser les descriptions de flot vasculaire déjà disponibles et de les adapter afin de pouvoir les jumeler aux modèles de filtration développés à l'occasion de nos expériences. Ainsi, il serait intéressant de pouvoir simuler la distribution de médicaments destinées à limiter la prolifération de l'intima et de la média dans le processus de formation de la plaque athérosclérotique. Cela nous aiderait aussi à améliorer les véhicules de ces médicaments qui sont actuellement les tuteurs et de développer de nouvelles méthodes de délivrer les médicaments.

**DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE PARTITION
DE L'ALBUMINE POUR LES GLOBULES ROUGES**

5. DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE PARTITION DE L'ALBUMINE POUR LES GLOBULES ROUGES

5.1. INTRODUCTION DU COEFFICIENT DE PARTITION DE L'ALBUMINE

Nous sommes intéressés à connaître le coefficient de partition de l'albumine entre l'intérieur et l'extérieur du globule rouge. Cela, afin de mieux comprendre l'influence de la présence des globules rouges en ce qui a trait à la diffusion de l'albumine du sang vers d'autres milieux. Toutefois, pour ce faire, nous devons premièrement comprendre le comportement du soluté dans le sang même. Pour ce faire, FOURNIER (1999) présente les caractéristiques qui sont nécessaires afin d'être en mesure de décrire le transport d'un soluté dans le sang, soit :

« ... the solute diffusivity and its red blood cell permeability, its equilibrium distribution between the plasma and the fluid within the red blood cell, and the kinetics of any chemical reaction it may undergo with other solutes... »

Nous nous sommes donc intéressés à un de ces aspects, soit le coefficient de diffusion entre l'intérieur des globules rouge et l'extérieur et qui est égal à :

$$K_{GR} = \frac{C_{GR}}{C_{plasma}}$$

Nous présenterons premièrement dans quel cadre mathématique le coefficient de partition est introduit pour ensuite présenter l'expérimentation faite afin de le déterminer en ce qui a trait aux globules rouges de lapin.

5.1.1. Développements à partir de la première loi de FICK

La première loi de Fick pour la diffusion est bien connue et bien établie. Cette dernière s'écrit ainsi et est présentée, entre autres, dans WILSON (2003) :

$$N = D \frac{d}{dx} C(x,t)$$

Dans cette équation, D est le Coefficient de diffusion, N est le flux de particule et C est la concentration.

FOURNIER (1999), qui s'est inspiré de COLTON et LOWRIE (1981), utilise la première loi de Fick afin d'exprimer le flux effectif N_{effectif} :

$$N_{\text{effectif}} = D_{\text{effectif}} \frac{d}{dx} C_{\text{effectif}}$$

Où D_{effectif} est le coefficient de diffusion effectif et C_{effectif} est la concentration effective.

Toujours en suivant FOURNIER (1999), nous sommes en mesure de développer C_{effectif} en connaissant l'hématocrite (H) et nous sommes en mesure de déterminer N_{plasma} :

$$C_{\text{effectif}} = HC_{GR} + (1-H)C_{\text{plasma}}$$

$$N_{\text{plasma}} = D_{\text{plasma}} \frac{d}{dx} C_{\text{plasma}}$$

Où D_{plasma} est le coefficient de diffusion du plasma et C_{plasma} est la concentration de la particule d'intérêt dans le plasma. Le développement suivant est une substitution pour obtenir :

$$N_{\text{effectif}} = D_{\text{effectif}} \frac{d}{dx} (HC_{GR} + (1-H)C_{\text{plasma}})$$

Nous pouvons ensuite terminer le développement présenté par FOURNIER (1999) en divisant l'équation précédente par celle exprimant N_{plasma} :

$$\frac{N_{\text{effectif}}}{N_{\text{plasma}}} = \frac{D_{\text{effectif}}}{D_{\text{plasma}}} \frac{d}{dx} (HK_{GR} + (1-H))$$

Nous voyons alors apparaître le terme K_{GR} qui est le coefficient de partition.

5.1.1.1. Applications

Nous pouvons séparer les situations possibles en trois, soit lorsque la membrane érythrocytaire est complètement perméable à la substance filtrée, soit partiellement perméable ou soit complètement imperméable. Selon FOURNIER (1999), dans le cas où la membrane serait totalement perméable, la diffusion ne sera pas affectée par la présence des globules rouges. Dans le cas où la membrane érythrocytaire est partiellement perméable au soluté étudié, les particules de soluté se diviseront. Une partie passera au travers du globule rouge et une autre partie qui devra contourner le globule rouge. Cette situation est probablement celle de l'albumine et de la plupart des protéines plasmatiques. Il faut préciser que nous connaissons certaines méthodes de mesure de la perméabilité de la membrane des globules rouges dont certaines sont présentées lors de la discussion.

La situation où la membrane érythrocytaire est totalement imperméable a été étudiée par COLTON et LOWRIE (1981) et ces derniers ont démontré que cette situation se traduit de manière intéressante par l'équation suivante avec une réduction importante du nombre d'inconnus :

$$\frac{D_{\text{effectif}}}{D_{\text{plasma}}}(HK_{GR} + (1 - H)) = \frac{2(1 - H)}{2 + H}$$

La mesure du coefficient de partition pour l'albumine peut nous aider à décrire l'influence des globules rouges lors de la filtration de l'albumine au travers des parois artérielles. Toutefois, il est entendu que les résultats de ces expériences pourraient servir afin d'étudier la filtration de d'autres macromolécules ou de drogues.

5.2. PROTOCOLES

5.2.1. Protocole pour la préparation des échantillons

5.2.1.1. Prélèvements

Les échantillons ont été pris sur 6 lapins mâles albinos New Zealand de 2,7 à 2,9 kg utilisés à l'occasion des expériences in vitro. Les prélèvements étaient faits dans le cadre de l'exsanguination qui suit inévitablement le sacrifice par guillotine des lapins. Le sang

frais a été recueilli dans des récipients contenant 10 μ l d'une solution d'EDTA (1,69mg/10 μ l) pour chaque ml de sang prélevé. Nous avons utilisé une solution d'EDTA la plus concentrée possible afin de ne pas induire une dilution trop importante de nos échantillons. À noter que nous avons utilisé l'héparine comme anticoagulant à l'occasion de manipulations semblables sans noter de différence sur les résultats subséquents.

5.2.1.2. Préparation des échantillons afin de mesurer l'albumine plasmatique

Pour chacun des lapins, nous avons utilisé 4 à 6 cc de sang prélevé et soumis ces prélèvements pour centrifugation à 13000 rotations par minute pendant 10 minutes. Le plasma a ensuite été mis de côté à -20°C en attendant de mesurer l'albumine ou les protéines dans les échantillons plasmatiques. Nous avons toujours effectué les analyses sur les plasmas dans les deux semaines qui suivaient les prélèvements.

5.2.1.3. Mesure de l'hématocrite et lavages

Pour chacun des lapins, nous avons mesuré l'hématocrite à l'aide d'un tube de verre hépariné que nous avons rempli avec le sang prélevé précédemment. Ce tube a été centrifugé et nous avons alors été en mesure de déterminer l'hématocrite. Notons que la mesure que nous utilisons pour l'hématocrite pour la suite de l'expérience est la moyenne d'au moins trois mesures pour chaque lapin.

Pour chacun des lapins, nous avons lavé une quantité connue de globules rouges. Effectivement, en sachant l'hématocrite, nous étions en mesure de connaître la quantité de globules rouges présents dans une quantité connue de sang. À noter que les lavages sont nécessaires afin d'éliminer le plasma et d'isoler les globules rouges. Ainsi, nous pouvons être en mesure de mesurer uniquement la contribution de l'intérieur des globules rouges pour la mesure des protéines. Il est à noter que nous n'avons pas enlevé les globules blancs de la préparation et nous reviendrons sur cette cause possible d'erreur dans la discussion. Nous avons effectué 5 lavages avec 10 volumes de NaCl 0,9 % pour les 4 à 6 échantillons d'une quantité connue de sang. La quantité de sang utilisée était 1 ml à l'occasion des expérimentations visant à mesurer les protéines de manière quantitative. Entre chacun des lavages, nous avons effectué une centrifugation à 3000 rotations par minute pendant 10 minutes à -4°C .

5.2.1.4. Hémolyse des globules rouges

À ce point, nous avons une quantité connue de globules rouges lavés de leur plasma. Plusieurs techniques d'hémolyses s'offraient à nous et avaient déjà été utilisées par d'autres dans le passé. Nous avons essayé le Triton X-100 (BIELAWSKI, 1990) sans toutefois obtenir une hémolyse complète comme nous le désirions. Nous avons aussi utilisé une méthode consistant à congeler et à décongeler les échantillons (RAPATZ et LUYET, 70) (PRIBOR, 1970), mais nous demeurions incertains que l'hémolyse avait été complète. Nous nous sommes donc tournés vers l'hémolyse osmotique qui est le standard d'hémolyse complète de certaines expérimentations (MALHEIROS et al.,

1998). Ainsi, nous avons ajouté un volume d'eau distillée de 1 ml au culot de globules rouges résiduel suite au lavage décrit précédemment de 1 ml de sang. Nous avons mélangé la solution ainsi formée sur un vortex afin de la rendre homogène avant de compléter les volumes à 7 ml avec une solution d'HEPES 50 mM à pH 8,1. Cela, pour chacun des tubes Falcons contenant les échantillons hémolysés.

5.2.1.5. Précipitation de l'hémoglobine

Rendu à ce point de l'expérience, nous avions alors une solution contenant les protéines de l'intérieur d'une quantité connue de globule rouge. Il ne restait plus qu'à faire la mesure de la quantité d'albumine présente dans la solution. Cette mesure ne s'est toutefois pas avérée aussi simple que prévue. Effectivement, toutes les techniques disponibles de mesure de l'albumine ne pouvaient pas être utilisées considérant l'interférence entraînée par la quantité importante d'hémoglobine en solution présente dans nos échantillons. Cela, que ce soit par une technique colorimétrique à partir du vert de bromocrésol (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) ou bien avec d'autres techniques comme l'immunodiffusion radiale (The Binding Site, Birmingham, Angleterre). Il devenait alors évident que nous serions dans l'obligation de procéder à la précipitation de l'hémoglobine avant de pouvoir mesurer les protéines présentes dans les échantillons.

Plusieurs options nous étaient disponibles en commençant par la précipitation par l'acide perchlorique (MIWA et SUZUKI, 2002) et la précipitation par le zinc. Particulièrement en ce qui a trait à la précipitation par le zinc, nous savions de

publications antérieures, que les enzymes présentes dans le supernatant sont fonctionnelles (VALENTINE et PAGLIA, 1983) (HOVER et KULKARNI, 2000). Ainsi, nous nous sommes inspirés des techniques décrites par FRANTZEN et al. (1997) pour les précipitations. Ces derniers présentaient les résultats assez complets de leurs manipulations afin de précipiter l'hémoglobine à l'aide de métaux lourds ou de mélanges d'alcools.

En ce qui a trait à la précipitation à l'aide de solutions d'alcool, nous avons ajouté aux tubes Falcons contenant les 7 ml de notre échantillon, une quantité de 1,750 ml d'une solution constituée d'une proportion de 60 / 40 d'éthanol 100 % (Les alcools de commerces inc, Montréal, Québec) et de 1-Butanol (Fisher, NJ, É.-U.). Pour la précipitation par le zinc, à d'autres tubes Falcons contenant les échantillons, nous avons ajouté 0,778 ml d'une solution de $ZnSO_4$ (Fisher, NJ, É.-U.) afin d'arriver à un excès molaire connu de Zinc sur l'hémoglobine. Les excès molaires généralement utilisés sont de 10, 14 ou de 18 (en supposant que la valeur d'hémoglobine totale dans le sang était de 130 g/l au moment du prélèvement avant les dilutions). Les solutions de $ZnSO_4$ afin d'arriver à des excès molaires de 10, 14 et de 18 étaient respectivement de 0,3337 %, 0,4672 % et 0,6007 %.

5.2.1.6. Démonstration de la présence de l'albumine dans les globules rouges à l'aide de chromatographies

Nous avons voulu premièrement démontrer la présence de l'albumine dans les globules rouges à l'aide d'une chromatographie par échange d'anions. Nous nous sommes encore là inspirés de la technique présentée par FRANTZEN et al. (1997). Nous avons utilisé un système monté par Amersham Pharmacia Biotech comprenant un appareil AKTA EXPLORER relié à un poste de travail utilisant le logiciel Unicorn version 3.21.02 (2000). La colonne utilisée a été une Mono Q HR 5/5, la solution de rinçage de la colonne était constituée de Tris 10 mM, EDTA 5 mM et NaCl 1 M à pH 7,5. La solution d'éluion quant à elle était formée de Tris 10 mM, EDTA 5 à pH 7,5. Tous les échantillons étaient préalablement passés dans un filtre Millex GP 0,22 µm avec une propriété de faible rétention des protéines avant d'être soumis à la chromatographie.

Les résultats des chromatographies sont présentés dans la section suivante. Brièvement, nous avons premièrement déterminé où sortait le pic d'albumine à l'aide d'un standard d'une solution d'Albumine bovine 4 % (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.). Ensuite, nous avons vérifié la présence d'albumine dans le sang total hémolysé. Ce dernier doit contenir de l'albumine considérant la présence d'albumine dans le plasma. Nous avons ensuite fait une chromatographie du surnageant suite à la précipitation de l'hémoglobine par le zinc. La dernière chromatographie est celle du précipité d'hémoglobine par le zinc afin de démontrer qu'il n'y a pas ou très peu d'albumine qui a précipité avec l'hémoglobine. À noter que nous avons resolubilisé le précipité suite à la précipitation

par le zinc à l'aide de la solution d'éluion. Nous n'avons toutefois pas été en mesure de resolubiliser le précipité suite à la précipitation par les alcools considérant la dénaturation irréversible des protéines entraînée par cette technique. Les résultats de chromatographies présentés ne concernent donc que la précipitation par le zinc.

5.2.1.7. Mesure des protéines dans le plasma et à l'intérieur des globules rouges.

Nous avons donc une solution dont l'hémoglobine a été précipitée et n'est donc plus en suspension. Nous n'avons toutefois pas été en mesure de mesurer de manière précise l'albumine. Effectivement, les techniques disponibles mesurent la quantité de protéines totales et font, ensuite une estimation de l'albumine à partir de cela. Les techniques mesurant l'albumine directement utilisent des anticorps contre l'albumine humaine. Une de ces technique a été tentée au laboratoire clinique du CHUS (BN Systems, DADE BEHRING, É.-U.), mais les anticorps dirigés contre l'albumine humaine n'ont pas réagi ni contre l'albumine de lapin des globules rouge, ni contre celle du plasma des lapins. Nous ne sommes donc pas en mesure de présenter la mesure de l'albumine à l'intérieur des globules rouges. Tel que notée dans la discussion, la mesure de l'albumine totale sera faite sur des échantillons de sang humain de volontaires sains dès que le protocole déposé au Comité d'éthique de la recherche sur l'humain sera accepté.

Les valeurs présentées sont celles des protéines totales que nous avons mesurées à l'aide de la technique de Bio-Rad (Californie, É.-U.). Il est à noter que les métaux lourds causent une interférence avec cette technique, ce qui n'est pas le cas avec le mélange

d'alcools. Bien que la fiche signalitique de la technique nous indiquait ce fait, nous nous en sommes assurés. Pour ce faire, nous avons comparé les valeurs obtenues pour la mesure des protéines totales dans le plasma avec les valeurs obtenues suite à l'ajout de zinc et du mélange d'alcools dans le plasma. Cela, en travaillant aux concentrations utilisées pour la précipitation usuelle de l'hémoglobine dans les globules rouges. Les valeurs obtenues avec le mélange d'alcools ne différaient pas de manière significative de celles sans, ce qui n'était pas le cas avec le zinc. Les résultats présentés en ce qui a trait aux protéines totales sont donc présentés suite aux précipitations avec les alcools.

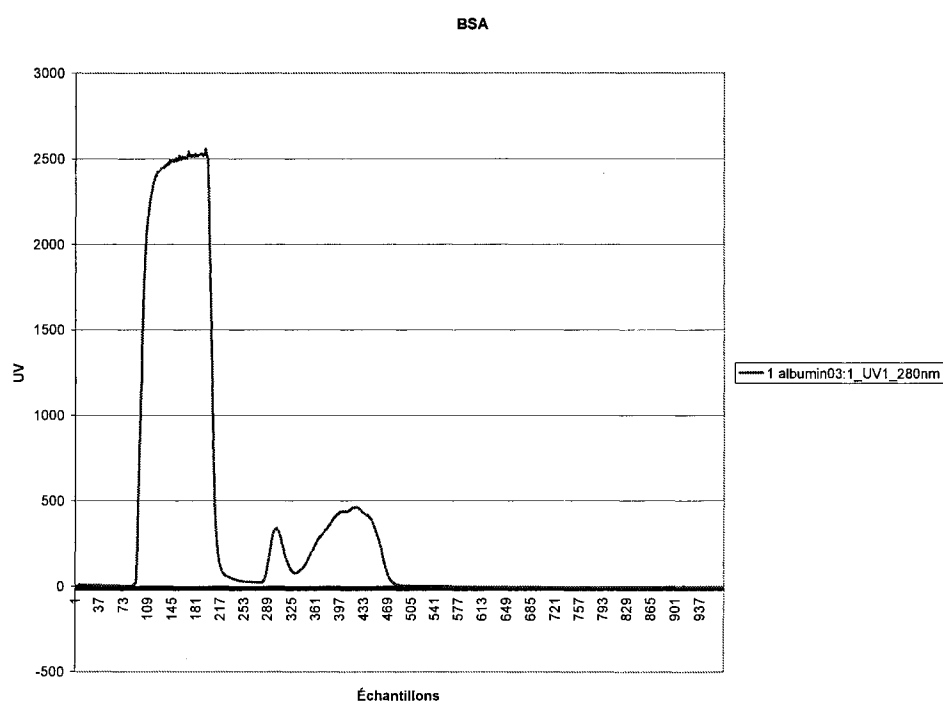


Figure 41 *Chromatographie par échange d'anions de l'albumine bovine*
 Échantillon d'albumine bovine 4 % dans d'HEPES 50 mM à pH
 8,1.

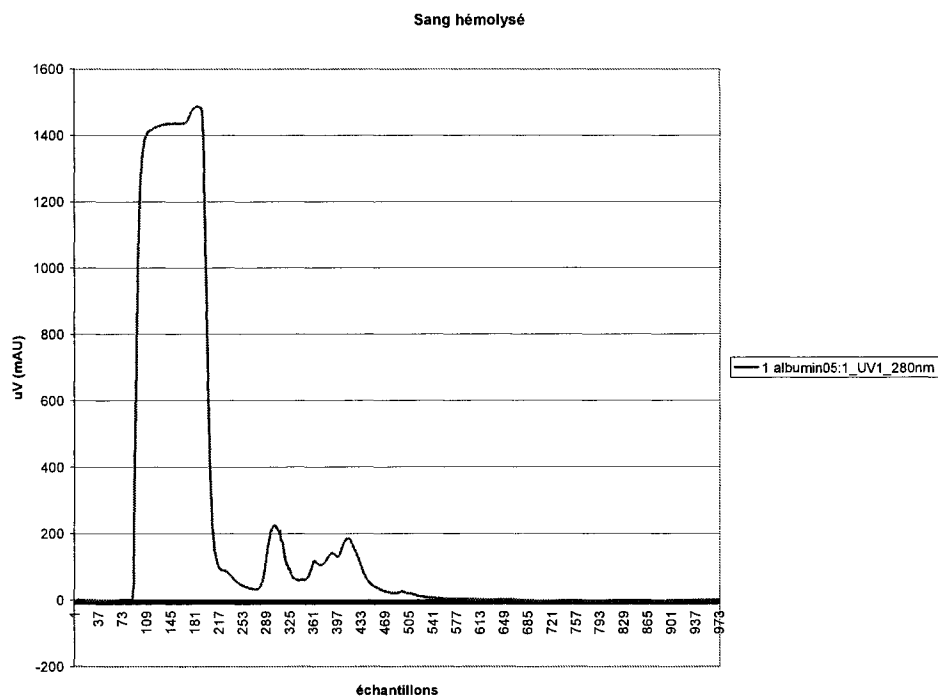


Figure 42 *Chromatographie par échange d'anions du sang complet de lapin hémolysé*
 Échantillons de 500 µl de sang complet hémolysés à l'aide de l'ajout de 1 ml d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété à 10 ml à l'aide d'une solution d'HEPES 50 mM à pH 8,1. Nous remarquons que les pics correspondants à l'albumine sont présents. Le pic d'hémoglobine est à la fin du pic des protéines qui ont une faible liaison avec la colonne.

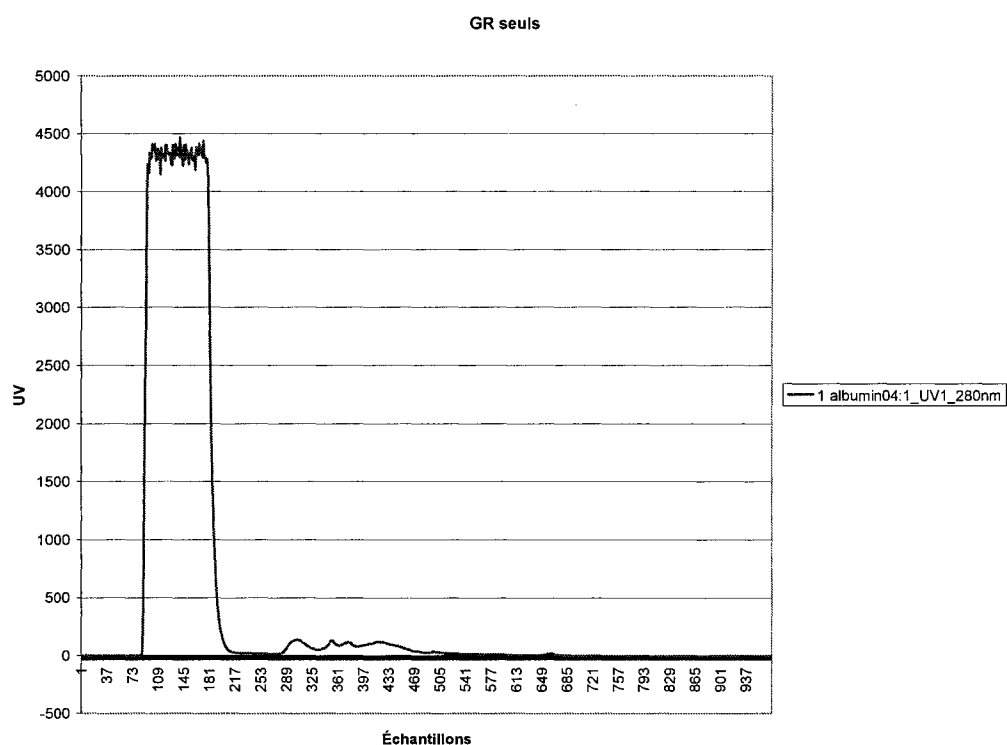


Figure 43 *Chromatographie par échange d'anions d'un échantillon de globules rouges seuls*

Échantillons faits à partir de lavage de 500 µl de sang complet hémolysé à l'aide de l'ajout de 1 ml d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété à 10 ml à l'aide d'une solution d'HEPES 50 mM à pH 8,1. La précipitation a été effectuée par un excès molaire de Zinc sur l'hémoglobine équivalent à 15. Nous remarquons que les pics correspondants à l'albumine et à d'autres protéines sont présents. Il y a donc des protéines et de l'albumine dans les globules rouges.

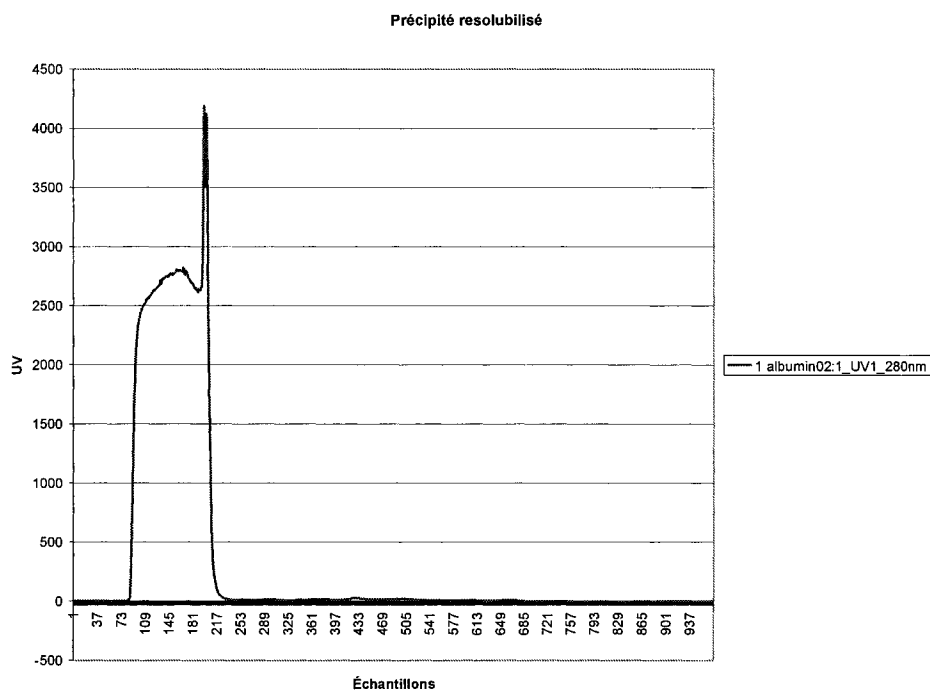


Figure 44 *Chromatographie par échange d'anions du précipité d'hémoglobine*

Échantillon fait à partir du précipité hémoglobine de la solution présentée à la chromatographie précédente. Le précipité a été resolubilisé dans la solution d'élution (Tris 10 mM, EDTA 5 à pH 7,5) avant d'être passé dans la colonne. Nous remarquons la présence du pic d'hémoglobine mais il n'y a pas ou très peu de protéines et d'albumine dans l'échantillon, ces dernières sont demeurées dans le surnageant.

Animal	Hématocrite (%)	Protéines totales plasma (g/l)	Protéines totales GR (g/l)	Coefficient de partition
Lapin 21	34,7	50,28	11,85	0,236
Lapin 22	38,5	49,77	10,23	0,206
Lapin 23	37,0	51,94	9,81	0,189
Lapin 24	36,9	48,10	9,49	0,197
Lapin 25	34,5	49,60	10,14	0,205
Lapin 26	37,5	53,03	10,15	0,191

Tableau III Mesure du coefficient de partition entre l'intérieur des globules rouges (GR) et le plasma de lapin pour les protéines totales

5.3. DISCUSSION

5.3.1. Critiques de l'expérience actuelle

5.3.1.1. Il y a fort probablement de l'albumine dans les globules rouges

Les courbes de chromatographie montrent un pic correspondant à l'emplacement de l'albumine lors de la chromatographie des globules rouges lavés et hémolysés. Ce pic n'est pas retrouvé lors de la chromatographie du précipité nous indiquant que le

précipité ne contient pas d'albumine. La précipitation n'induit donc pas une erreur importante en ce qui a trait à la quantité d'albumine présente dans la solution provenant de l'hémolyse des globules rouges lavés. Nous pouvons donc avoir une indication raisonnable en faveur de la présence de l'albumine à l'intérieur des globules rouges.

Toutefois, tel que noté précédemment, nous n'avons pas été en mesure de détecter la présence d'albumine seule avec les essais disponibles directement pour la mesure de l'albumine. Ces derniers utilisent des anticorps contre l'albumine humaine qui n'entrent pas en réaction avec l'albumine de lapin. Les techniques que nous avons utilisées n'ont pas été en mesure de détecter l'albumine de lapin dans aucun échantillon en provenance de lapin, pas même dans le plasma. Ainsi, afin de mesurer l'albumine, nous avons le choix entre construire une technique visant la mesure spécifique de l'albumine chez le lapin ou bien refaire la technique avec de l'albumine humaine (nous savons que l'essai clinique spécifique serait en mesure de la reconnaître). Cette dernière option a été retenue et nous avons fait une demande au Comité d'éthique de la recherche sur l'humain afin d'obtenir des prélèvements de sang humain. Au moment d'écrire ces lignes, nous attendions encore la réponse du Comité d'éthique afin de poursuivre.

5.3.1.2. Mesures des protéines totales et non de l'albumine, présence d'anhydrase carbonique ?

Nous avons donc été en mesure de mesurer le coefficient de partition des protéines totales entre l'intérieur des globules rouges et le plasma de lapins. En effectuant la

moyenne sur les six lapins de l'expérience, nous obtenons une valeur de $0,204 \pm 0,017$ pour le coefficient de partition des protéines totales. Nous pouvons utiliser cette approximation dans les modèles mathématiques avec une certaine confiance lorsque nous travaillons avec les protéines totales. Aussi, nous pouvons penser que le coefficient de partition de l'albumine sera semblable à celui des protéines totales et nous pouvons probablement utiliser cette valeur comme approximation. Toutefois, il est plus sage d'attendre les résultats avec la mesure du coefficient de partition de l'albumine et des protéines totales chez l'humain avant de pouvoir conclure.

Les analyses des courbes de chromatographie par échange d'anions suggèrent fortement que l'albumine constitue la majeure partie des protéines présentes dans le cytoplasme des globules rouges. Toutefois, nous savons que d'autres protéines sont présentes en grande quantité à l'intérieur du cytoplasme du globule rouge, lui permettant d'assumer ses fonctions. C'est le cas de l'anhydrase carbonique (MAREN, 1967) qui est responsable d'hydrater le CO_2 en HCO_3^- . Le HCO_3^- est ensuite en partie échangé contre du Cl^- par un transporteur membranaire de la bande 3 de la membrane érythrocytaire (KIFOR et al., 1993). De plus, nous savons que l'anhydrase carbonique est absente de la membrane érythrocytaire demeurant dans le cytosol (RANDALL et MAREN, 1972). Des analyses subséquentes sont à faire afin de déterminer la présence de l'anhydrase carbonique dans les protéines que nous avons analysées, mais advenant le cas, nous pourrions étudier les conditions faisant varier la concentration d'anhydrase carbonique cytoplasmique de l'érythrocyte.

5.3.1.3. Mesures faites chez le lapin et non chez l'humain

Nous n'avons aucune raison de croire que la distribution de l'albumine entre le plasma et l'intérieur des globules rouges est différente selon les espèces. Toutefois, sur les prélèvements de globules rouges humains, nous allons mesurer la concentration des protéines totales et de l'albumine afin de vérifier si le coefficient de partition des protéines totales est différent entre les espèces.

5.3.1.4. Perte de protéines dans les lavages

Nous devons préciser qu'afin de séparer les globules rouges de leur plasma, nous avons lavés les érythrocytes avec une solution isotonique. Cette solution ne contenait volontairement pas de protéine. Les manipulations des lavages étaient toujours faites rapidement suivant la centrifugation du lavage précédent. Toutefois, nous ne savons actuellement pas si la quantité de protéines cytoplasmiques perdues au cours des lavages est significative. Cela dépend de la perméabilité de la membrane du globule rouge aux protéines et nécessite qu'un transfert significatif puisse se faire en moins de 2 heures. Nous ne savons pas encore les réponses à ces questions, mais certaines expériences sont en cours afin de tenter d'y répondre.

5.3.2. Expériences futures à prévoir afin de mesurer la perméabilité des globules rouges

Certaines expériences pourraient être menées afin de déterminer le niveau de perméabilité des membranes des globules rouges aux protéines et plus précisément à l'albumine. Cette dernière information nous permettra de décrire encore davantage le transport des protéines dans le sang et par la suite au travers des parois artérielles.

Une manière simple de mesurer *in vitro* la perméabilité des globules rouges serait de mettre en contact *in vitro* des globules rouges avec différentes concentrations d'albumine marquée pour des temps différents. Ensuite nous devrions mesurer la concentration de l'albumine marquée dans les globules rouges pour déduire les mouvements des molécules. À noter que cette technique aurait aussi été une méthode de mesurer indirectement la concentration d'albumine à l'intérieur des globules rouges en effectuant les mesures à l'état d'équilibre. Ce type d'expérience a été fait par le passé à de nombreuses reprises dans le cas du développement des principes entourant les transferts de masse lors d'hémodialyse de patients urémiques (CHEUNG et al. 1983). Un procédé semblable qui utilise la distribution d'une substance à l'équilibration permet de faire l'estimation de la perméabilité au glucose des érythrocytes des carpes (TIIHONEN et NIKINMAA, 1991).

Toutefois les méthodes les plus intéressantes et les plus précises de mesurer la perméabilité des globules rouges reposent sur la résonance magnétique nucléaire. Cette

technique a été développée pour déterminer la perméabilité de la membrane des globules rouges à l'eau et les mouvements d'eau au travers de la paroi (BENGA et al., 1990) (FEDERICO et al., 1996). Nous pourrions envisager suivre l'albumine marquée dans ses déplacements entre l'intérieur et l'extérieur des érythrocytes avec une technique semblable si l'albumine était marquée avec une substance en mesure d'entrer en précession et qu'il est possible de suivre en résonance magnétique.

**INFLUENCE DU FLOT ARTÉRIEL PULSÉ VERSUS
CONTINU SUR LA PHYSIOLOGIE**

6. INFLUENCE DU FLOT ARTÉRIEL PULSÉ VERSUS CONTINU SUR LA PHYSIOLOGIE

Ce chapitre présente le développement d'un protocole de recherche s'inscrivant dans le cadre des expérimentations actuellement en cours par le groupe dirigé par le Pr André GARON, de l'École Polytechnique de Montréal, et par le Dr Michel CARRIER, de l'Institut de cardiologie de Montréal. Le groupe tente de mettre au point une pompe d'assistance ventriculaire axiale en flot continu. Le protocole présenté dans ce chapitre vise à explorer à l'occasion de ces essais l'impact d'un flot continu sur la physiologie.

6.1. CADRE DANS LEQUEL S'INSCRIT LE PRÉSENT PROTOCOLE

L'insuffisance cardiaque est un défi majeur de la médecine moderne. Cela, principalement dans le cas des patients ayant une mauvaise classe fonctionnelle (surtout en classe III ou IV) sous thérapie médicale optimale et n'étant pas candidats pour une greffe cardiaque. Les dernières années ont vu l'introduction dans les pratiques usuelles de traitement des patients insuffisants cardiaques de nombreuses thérapies nouvelles s'ajoutant à celles que nous avons déjà. Ces dernières sont non seulement de nouvelles médications, mais aussi de nouveaux appareils utilisant les développements technologiques (défibrillateurs implantables, resynchronisateurs, assistances ventriculaires, cœur artificiel, ...) (COLUCCI, 2004). Toutefois, les taux de mortalité

des patients en insuffisance cardiaque avancée demeurent élevés et la qualité de vie de nombreux patients est diminuée par les atteintes fonctionnelles liées à la maladie (COLUCCI, 2003). C'est dans ce contexte qu'il est nécessaire de poursuivre les recherches afin de développer de nouvelles avenues de traitement de l'insuffisance cardiaque en plus de tenter de prévenir la survenue de cette maladie. Dans ce contexte, le développement de nouveaux modes de traitement est souhaitable en incluant l'amélioration des moyens artificiels de remplacer, ou plus fréquemment de soutenir la fonction cardiaque. Bien que de nombreux laboratoires travaillent sur le sujet depuis de nombreuses années (NOSE et al., 2000), l'installation de pompes d'assistance ventriculaire demeure un événement rare pour de nombreuses raisons en commençant par le coût, les limitations techniques et l'efficacité. Toutefois, des études récentes faites sur un faible nombre de patients montrent des résultats très prometteurs en ce qui a trait à l'amélioration de la survie et de la qualité de vie avec l'installation de pompes d'assistance ventriculaire chez des patients en insuffisance cardiaque avancée et n'étant pas candidat pour une greffe (ROSE et al., 2001). Ces résultats encourageants des dernières années ont relancé de plus belle les travaux sur le sujet et plusieurs prototypes sont actuellement en développement ou en essai. Certains de ces prototypes utilisent un flot continu au lieu de pulsé. Effectivement, les problèmes d'hémolyse et de thrombose sont plus facilement évitables avec les pompes en flot continu, en plus de pouvoir être conçues plus petites (ALLEN et al., 1997). De plus, les pompes en flot continu sont moins onéreuses du fait d'une conception plus simple (NOSE, 2000).

Comme nous allons le détailler plus tard, de nombreux groupes ont observé des différences significatives non seulement sur le plan de l'hémodynamie, mais aussi dans le comportement physiologique des sujets animaux ou humains soumis à un flot de perfusion continu en comparaison à un flot pulsé. Les premières expérimentations sur le sujet ont été faites à l'occasion du développement des appareils afin d'assurer la circulation extracorporelle dans le cadre de chirurgies cardiaques (PAQUET, 1969) ou bien lors du développement de pompes d'assistance ventriculaire et de cœurs artificiels sur des animaux (DALTON et al. 1965). Il est à préciser que la grande majorité des équipes ayant travaillé sur le sujet ont remarqué des différences en ce qui concerne la physiologie en flot continu comparé avec le flot pulsé. Toutefois, le groupe de NOSE et al. (2000) n'a pas remarqué ces différences physiologiques à l'occasion du développement de certaines pompes en flot axial continu à la condition que le flot sanguin en continu soit maintenu de 20 % plus élevé que serait une perfusion pulsée acceptable pour les sujets étudiés. Précisons que ce groupe précise qu'il était difficile d'atteindre cet objectif lors des expériences considérant que la pompe devait vaincre des résistances périphériques élevées.

Cela dit, en plus de ces discordances actuellement présentes dans la littérature, il faut préciser que la pompe axiale, actuellement en développement par le groupe dirigé par le Pr André GARON et le Dr Michel CARRIER, ne délivre pas un flot purement continu. Effectivement, l'efficacité optimale d'une pompe axiale d'assistance ventriculaire n'est probablement pas dans le cas d'une valve aortique fermée complètement. Ainsi, dans le

cas d'une valve aortique qui peut s'ouvrir, une légère pulsation systémique est générée du fait de la sommation du flot continu de la pompe et du flot pulsé fourni par le ventricule gauche défaillant. De plus, dans le cas d'un ventricule gauche normal où serait implanté une pompe d'assistance ventriculaire, si l'on s'organise pour fermer la valve aortique, il restera une légère pulsation systémique générée par la contraction et la relaxation du ventricule de la même manière qu'est formée l'onde c dans la courbe de pression auriculaire normale. De plus, le ventricule gauche en se contractant et en se relaxant crée une variation de pression à l'entrée de la pompe et donc un changement dans le point d'opération de la pompe. Cela entraîne une variation périodique dans le flot à la sortie de la pompe. Chez des patients en défaillance cardiaque, le ventricule gauche n'entraîne pas ces variations de pression importante lorsque la pompe fonctionne à valve aortique fermée et la perfusion systémique s'approche d'un flot continu. À noter qu'une autre raison pour faire ouvrir la valve aortique est afin d'éviter la fusion des feuillets valvulaires, ce qui n'est pas recommandé si on doit sevrer ultérieurement un patient de la pompe. De plus, permettre l'ouverture de la valve aortique permet de chasser le sang stagnant du ventricule gauche et ainsi d'éviter la formation de thrombus. Enfin, il faut préciser que l'hypothèse d'une efficacité maximale d'une pompe d'assistance ventriculaire à flot continu en gardant la valve aortique ouverte reste à être démontrée à l'occasion des essais en cours.

Les expériences sur la physiologie seront principalement faites dans la situation de fonctionnement usuel prévu pour la pompe actuellement en développement par le

groupe de Pr André GARON et de Dr Michel CARRIER. Toutefois, il est à préciser que nous tenterons de valider les impacts physiologiques d'un flot totalement continu en effectuant certains essais avec un débit de pompe suffisant afin d'obtenir une fermeture de la valve aortique. Afin de déterminer les aspects à observer et sur lesquels il est nécessaire de mettre l'emphase lors des essais des pompes axiales à l'Institut de Cardiologie de Montréal, nous nous sommes intéressés aux différences de physiologie qui ont été observées antérieurement entre les flots pulsés et continus. À noter que ce protocole traite uniquement des différences en ce qui concerne la physiologie proprement dite. Les optimisations du « design » de la pompe, les algorithmes de fonctionnement, les paramètres hémodynamiques et la réduction de l'hémolyse font partie de d'autres protocoles distincts à l'occasion des essais des pompes.

La première étape de recherche consistait à déterminer les concepts à approfondir et à valider à partir des expériences antérieurement publiées. Ainsi, nous serions en mesure de développer un protocole expérimental ciblant le maximum de champs d'intérêts possibles considérant la quantité importante de ressources nécessaires pour un essai de pompe d'assistance ventriculaire. L'application de la version finale de ce protocole sera mis en place aux cours des prochains mois et années à l'occasion de l'évolution des essais de pompes du groupe de Pr André GARON et de Dr Michel CARRIER.

6.2. DIFFÉRENCE ENTRE LA PHYSIOLOGIE EN FLOT PULSÉ ET CONTINU : LES CONNAISSANCES ACTUELLES

6.2.1. Études comparatives sur le devenir global des patients

Une étude rétrospective portant sur le devenir de 1820 patients après une chirurgie cardiaque pour pontages aorto-coronariens a été publiée récemment. Cette dernière étude comportait toutefois certains biais importants considérant son caractère rétrospectif et le fait que les patients, dans le groupe avec circulation pulsée, étaient plus à risque au départ. Cela dit, l'analyse multivariées faite par la suite n'a pas démontré de bénéfice significatif à un type de flot par rapport à un autre (ABRAMOV et al., 2003).

Il est à noter que le bénéfice d'un flot pulsé comparativement à un flot continu a été principalement observé dans le contexte de chocs et d'ischémie. Ces observations avaient été soumises par HORNICK et TAYLOR (1997) qui concluaient que le bénéfice d'un flot pulsé se retrouvait principalement chez les patients plus à risque.

6.2.2. Différences sur l'endothélium

Comme nous en discutons dans le chapitre 3, il a été démontré sur des cellules en culture que les cellules endothéliales s'orientent selon la direction du flot, qu'il soit laminaire ou pulsé (KAMM, 2002). Aussi, certaines différences d'organisations ont probablement lieu au niveau de la structure même des cellules endothéliales et de leur

organisation. Effectivement, in vitro, les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines exposées à un flot continu, au contraire de pulsé, démontrent une réorganisation du cytosquelette et une redistribution de la cadherine vers les contacts intercellulaires (PLANT et LEACH, 2002). Nous ne savons toutefois pas l'impact de cette observation dans des expérimentations in vivo.

6.2.3. Différences sur la physiologie cardiaque

Les expériences de MURAI et al. (2003), soit des essais d'assistances biventriculaires en flot continu sur des veaux sains, montrent que le cœur de ces derniers s'adapte à la pompe d'assistance en diminuant son débit au bout de deux semaines. Nous ne savons toutefois pas ce qu'il en est de la réponse d'un cœur malade. Effectivement, nous n'avons pas retrouvé de données sur le sujet depuis la communication de MADDOUX et al. (1976) qui ont observé que les patients devant subir un pontage aorto-coronarien ont davantage de chance d'avoir une meilleure fraction d'éjection ventriculaire gauche au 10^e jour post infarctus si la circulation extracorporelle était en flot pulsé au moment de l'opération. Cette observation est toutefois faite dans un contexte fort différent de celui des pompes d'assistance ventriculaire en flot continu pour usage chronique.

Tel qu'avancé par WESTABY et al. (1998), plusieurs expériences et essais à l'occasion du développement des pompes d'assistance ventriculaires vont dans le sens d'une récupération possible de la fonction myocardique suite à la mise au repos du cœur par le biais d'une assistance ventriculaire. Certaines données récentes confirment cette

hypothèse et montrent que les cardiomyocytes, dans le cas de cardiomyopathies dilatées seraient en mesure de récupérer une partie de leur fonction sur une période d'environ 1 an (HETZER et al., 1999). Ces données ont été confirmées d'une manière élégante par le groupe de VATTA et al. (2002) qui ont utilisé leurs résultats précédents sur la dystrophine à l'effet que la terminaison amino N-terminale de la dystrophine est anormale dans les cellules des ventricules défailants peu importe la cause de cette défaillance. Cette anomalie est corrigée par le support du ventricule par une pompe d'assistance ventriculaire. Les hypothèses afin d'expliquer les anomalies de la dystrophine sont au niveau de protéases pouvant être activées par les cytokines lors des décompensations d'insuffisance cardiaque (VATTA et al., 2004) ou bien par d'autres stress (XI et al., 2000). En ce qui concerne les assistances ventriculaires en flot continu, le groupe de VATTA et al. (2004) a évalué in vivo chez l'humain que la récupération des anomalies de la dystrophine se retrouve chez les patients avec des assistances ventriculaires en flot continu ou pulsé, mais que la récupération est plus grande avec un flot pulsé.

6.2.4. Différences en ce qui concerne les grands troncs artériels

Le groupe de SAITO et al. (2002) a observé des différences en ce qui concerne l'histologie des parois vasculaires des animaux avec une pompe d'assistance ventriculaire en flot continu lors d'expériences chroniques (30 à 340 jours). La différence était au niveau de la média qui était plus mince après exposition au flot continu. Ce qui est facilement concevable si nous retirons le stress hémodynamique

pulsé. L'incidence clinique de cet aspect peut avoir une répercussion majeure si le patient qui a une pompe en flot continu depuis plusieurs mois est candidat pour une greffe cardiaque. Est-ce que la média sera assez résistante afin de supporter un flot pulsé de nouveau après la greffe ou bien si ces patients seront plus sujets à des dissections artérielles ?

6.2.5. Différences sur la physiologie rénale

Les premières évidences de différences entre les flots pulsés et continus en ce qui concerne les reins datent depuis le milieu des années 1960. Le montage de MANY et al. (1969) est un des premiers à être en mesure d'isoler, au moyen d'un compartiment d'amortissement, la circulation rénale et de transformer la pression artérielle systémique pulsée en pression continue uniquement au niveau des artères rénales chez l'animal. C'est derniers ont démontré une diminution de l'excrétion du sodium et de l'eau avec un flot continu. Ces changements en flot continu étaient reliés, selon les auteurs, à une augmentation de la production de rénine par l'appareil juxtaglomérulaire. Il faut préciser que lors de ces expériences, il était incertain que la différence au niveau de la natriurèse et de la diurèse était due entièrement à l'effet du flot continu et non à l'effet d'une baisse du flot rénal total. Dans quel cas il est bien connu qu'il y aura une baisse de l'excrétion du sodium et de l'eau (THOMPSON et PITTS, 1952). Toutefois le groupe de GOODMAN et al. (1976) ont aussi observé l'augmentation de rénine sur des modèles canins avec un appareillage semblable et ont en plus démontré que lors d'un flot de perfusion continu aux artères rénales, ils observaient une diminution de la perfusion du

cortex externe rénal et une augmentation de la perfusion médullaire. Des résultats très semblables ont été observés par MORI et al. (1988) chez les chiens après un épisode d'arrêt cardiopulmonaire hypothermique lorsque l'assistance systémique est en flot pulsé ou continu. Chez les chiens perfusés de manière continue, MORI et son groupe ont noté que ces derniers n'avaient pas de perfusion du cortex rénal et une baisse de la perfusion de la médulla. Les mêmes données ont été rapportées par SEZAI et al. (1999) dans un modèle de pompes d'assistance systémique biventriculaires chez le porc. Les reins des porcs avec un flot continu étaient moins bien perfusés de manière globale tandis que les reins des porcs ayant un flot pulsé montraient une augmentation de la perfusion au niveau du cortex rénal et une diminution de la perfusion au niveau médullaire (SEZAI et al., 1999) (SEZAI et al., 1997). Ce même groupe (SEZAI et al., 1998) avait démontré précédemment que la microcirculation rénale était anormale dans les groupes de cochons sous assistance systémique en flot continu suite à un infarctus du myocarde. Toujours dans un contexte aigu, le groupe de KONISHI et al. (1996) a observé que dans le contexte d'une ischémie rénale chez le cochon, la pression pulsée améliorait le devenir de la fonction rénale comparativement à une perfusion en flot continu.

Dans le même créneau, des expériences ont aussi été menées chez l'humain à l'occasion de chirurgies cardiaques avec circulation extracorporelle (PHILBIN et al., 1981). En ce qui a trait à la rénine, ce groupe a observé qu'il n'y avait pas de changement significatif pendant la circulation extracorporelle, mais qu'il y avait une plus grande augmentation

après la chirurgie dans le groupe avec flot continu. Nous retrouvons des résultats semblables à l'occasion des essais pour la préservation optimale des organes dans le cadre de greffes. Ces essais ont démontré qu'il y avait une augmentation de la sécrétion de rénine par les reins perfusés avec un flot continu, mais que le devenir des greffes était le même peu importe le système de perfusion utilisé (TOLEDO-PEREYRA et al., 1973). Tous ces résultats vont dans le sens d'une sécrétion accrue de rénine par l'appareil juxtaglomérulaire lors de perfusion rénale en flot continu. Toutefois dans un contexte plus chronique (2 semaines), lors d'essais de pompes d'assistance ventriculaire sur des veaux, il n'y a pas eu de différence observée en ce qui concerne la rénine et la clairance de la créatinine entre le groupe avec pompe d'assistance en flot pulsé ou continu (JOHNSTON et al., 1976). À l'inverse, une étude de manière chronique (30 à 340 jours) plus récente (SAITO et al., 2002) chez la chèvre a démontré une augmentation de la rénine dans le groupe avec flot continu en comparaison avec un groupe contrôle. Les fonctions rénales sont toutefois demeurées dans les limites de la normale pour les deux groupes de cette expérience.

Toujours en ce qui a trait aux reins, le groupe de KIHARA et al. (2003) a mené des expériences chroniques sur des veaux qui ont subi l'implantation d'une pompe d'assistance ventriculaire en flot continu. Ils ont remarqué que près de 80 % des veaux ayant une pompe d'assistance ventriculaire avaient une hypertrophie des artères du cortex rénal contre aucun des veaux du groupe ayant eu l'installation d'un appareil placebo. Il faut toutefois préciser que les changements pathologiques observés sont

probablement multifactoriels. À noter que ces résultats vont dans le sens inverse des observations de LOUTZENHISER et al. (2002) à l'effet que la réactivité vasoconstrictrice des artéioles afférentes rénales pourrait davantage être due à l'hypertension systolique et non à la pression artérielle moyenne.

6.2.6. Différences sur la physiologie endocrinienne

Les effets d'un flot continu versus pulsé sur le métabolisme de certaines fonctions endocriniennes ont aussi été antérieurement étudiées. Toutefois les évidences des différences sont peu détaillées et reposent sur peu de publications et nous ne savons pas si ces variations pourraient entraîner un impact clinique.

En contradiction avec les observations citées précédemment dans la section sur le rein, le groupe de LEVINE et al. (1978) a observé une augmentation de la natriurèse lors d'un flot continu en comparaison du flot pulsé. Toutefois, l'intérêt supplémentaire de l'étude est que cette dernière était dans le cadre de chirurgie cardiaque chez l'humain et non l'animal et qu'elle démontrait une augmentation de la vasopressine dans le groupe avec flot continu en comparaison avec le flot pulsé. PHILBIN et al., (1981), encore à l'occasion de circulation extracorporelle chez l'humain, ont aussi observé que le groupe de patients avec circulation continu avait une plus grande élévation de la vasopressine et aussi de la norépinéphrine. Ces observations concordent avec celles de DIVONIN et al. (1990) à l'effet qu'une plus grande vasoconstriction périphérique est présente chez les patients ayant une circulation extracorporelle en flot continu. De plus, ces résultats sont

congruents avec ceux de YOZU et al. (1994) qui ont observé que l'augmentation de la norépinéphrine avec l'effort était plus prononcée dans un groupe de veaux avec une pompe en flot continu qu'une pompe en flot pulsé. Aussi, il est à préciser que les essais animaux d'un autre groupe, celui de TAENAKA et al. (1990) n'ont pas montré de différence entre un flot continu et pulsé lorsque comparé pour le même animal en ce qui a trait à l'épinéphrine, la norépinéphrine et les composantes du système rénine-angiotensine et aldostérone.

En ce qui a trait à d'autres fonctions endocriniennes, le groupe de TAYLOR et al. (1978) a étudié deux groupes de 10 patients chacun dans le cadre de chirurgies cardiaques. Ces derniers ont démontré que le flot continu entraînait une diminution de la sécrétion de cortisol et que cette diminution était prévenue par le flot pulsé. Ce même groupe (TAYLOR et al., 1978) a aussi démontré que les patients opérés avec une perfusion en flot continu avait une moins bonne réponse à la stimulation au TRH que les patients opérés sous flot pulsé. Ces résultats sont concordants avec ceux de BUKET et al. (1994) qui ont démontré que les patients ayant une chirurgie cardiaque sous perfusion avec flot pulsé avaient une moins grande diminution de T_3 que ceux du groupe avec flot continu.

6.2.7. Différences au niveau pulmonaire

Les groupes de TAGUCHI et al. (1988) et de SEZAI et al. (1998) ont observé que les pneumocytes montraient des changements œdémateux lors des perfusions en flot

continu en comparaison avec le flot pulsé chez l'animal (chiens). En contradiction avec les résultats précédents et aussi chez l'animal (cochons), ces changements œdémateux ont été retrouvés de manière équivalente dans les poumons des deux groupes lors d'une comparaison *in vitro* de perfusion en flot pulsé ou continu (BRANDES et al., 2002).

6.2.8. Différences au niveau hépatique

Le groupe de SEZAI et al. (1996) a observé les effets d'un flot continu et pulsé sur la récupération des organes et sur la microcirculation de cochons suite à un choc cardiogénique induit par un infarctus du myocarde. Ces derniers ont observé que le flot pulsé était supérieur au flot continu en ce qui a trait à la microcirculation hépatique et à la quantité de cétones artérielles. Un groupe russe (DIVONIN et al., 1991) a même observé une augmentation de la bilirubine lors de leurs expériences en flot continu. Toutefois, à l'inverse, dans un contexte chronique, les chèvres du groupe de SAITO et al. (2002) ayant une assistance ventriculaire en flot continu et un flot sans pulsations ne démontraient pas de différence de manière chronique en ce qui a trait aux tests de fonctions hépatiques.

6.2.9. Différences sur la physiologie cérébrale

Il y a longtemps que nous avons le concept, qu'à l'exception d'une lésion cérébrale de quelque origine que cela soit, les flots pulsés et continus sont équivalents en terme de flot sanguin cérébral et de métabolisme au moment d'une circulation extracorporelle à 27 °C (HINDMAN, 1994). Toutefois, à l'occasion d'une insulte cérébrale comme

l'ischémie, le flot pulsé semble montrer des avantages sur ces mêmes paramètres (ANSTADT et al., 1993) (TRANMER et al., 1986).

Une étude chez des enfants devant avoir une chirurgie avec circulation extracorporelle a rapporté que le flot cérébral était relié à la quantité de flot de la pompe et n'a pas révélé de changement entre les modes pulsés et continus lorsqu'utilisés en alternance chez le même enfant (CHOW et al., 1997). Dans le même sens, HINDMAN et al. (1995) ont utilisé 16 lapins et n'ont pas retrouvé de différence entre les flots pulsés et continus en ce qui a trait au flot sanguin cérébral et au taux métabolique en oxygène du cerveau.

Plus récemment, POTAPOV et al. (2001) ont évalué des patients en aigu soumis à une pompe d'assistance ventriculaire en flot pulsé (NOVACOR N100) ou soumis à une pompe d'assistance en flot continu (DeBAKEY). Ce groupe a mesuré deux marqueurs de dommages cérébraux, soit l'enzyme enolase spécifique aux neurones et une protéine relâchée par les astrocytes et cellules de schwann endommagés (S-100B). POTAPOV et al. (2001) n'ont pas retrouvé de différence significative entre les groupes après l'implantation des pompes en flot continu et pulsé.

6.2.10. Systèmes de régulation

Il est connu depuis longtemps que le système nerveux autonome est en mesure de produire des oscillations sous forme d'effets vasomoteurs au niveau du système cardiovasculaire. Dans ce sens, un groupe a fait l'étude de la microcirculation des patients lors

de chirurgies impliquant une circulation extracorporelle en flot continu. Ces derniers ont observé des oscillations entre 0,07 et 0,13 Hz au niveau de la microcirculation (PODGOREANU et al., 2002). Les auteurs concluent à une régulation vasomotrice du système parasympathique afin de fournir une réponse homéostatique à la dépulsation. Toutefois, nous ne connaissons pas l'implication exacte que ces mécanismes pourraient avoir dans l'impact physiologique des assistances ventriculaires en flot continu.

En ce qui a trait à la réponse du sinus carotidien à la mise en place d'un flot continu, le groupe de TANAKA et al. (2003) a observé que les impulsions nerveuses en provenance du sinus carotidien de rats devenaient irrégulières lorsque le flot était modifié de pulsé vers continu. De plus, la réponse du nucleus tractus solitarius était inadéquate en flot continu en rapport à la situation hémodynamique présentée. Toutefois, encore dans cette situation, nous ne savons pas l'impact clinique de cette dérégulation probable.

Ces observations d'un dérèglement pourraient peut-être expliquer la légère pulsation périphérique induite par une cause inconnue (TSUTSUI et NOSE, 1986) lors du suivi de l'évolution de 5 veaux ayant eu l'installation d'une pompe d'assistance ventriculaire en flot continu.

6.2.11. Progression ou régression de l'athérosclérose

Nous ne savons pas si un flot continu est un terrain favorable ou non à la progression de l'athérosclérose. Nous pourrions penser que la diminution des stress mécaniques induits

lors de flots pulsés serait favorable à l'arrêt de progression des plaques. Toutefois, nous ne savons pas quels seraient les impacts des changements probables de l'endothélium que nous avons décrit précédemment sur le développement des plaques. En ce qui a trait à la stagnation des particules de la lumière auprès des parois artérielles, SCHIMA et al. (2003) ont observé qu'il n'y avait pas de différence entre les flots pulsés et continus au niveau carotidien à l'occasion de simulations informatiques. Toutefois, l'aspect de la progression des plaques serait à évaluer à l'occasion d'un essai in vitro considérant qu'une simulation ne prend en compte uniquement qu'une partie des éléments causals reliés au complexe problème qu'est l'athérosclérose.

6.2.12. Impact sur la fonction immunitaire

Le groupe d'ANKERSMIT et al. (2002) a démontré que les patients implantés d'une pompe DeBakey en flot continu subissent une diminution de leurs fonctions immunitaires, probablement médiée par l'apoptose, dans les 10 premiers jours suivant l'implantation de l'assistance ventriculaire. Les anomalies se corrigeaient après 7 semaines et il n'y a pas eu de septicémie dans les 10 premières semaines pour les 6 patients de l'étude. Des déficiences immunitaires avaient aussi été observées par DRIESSEN et al. (1995) à l'occasion de 19 patients ayant eu une chirurgie cardiaque pour des pontages aorto-coronariens. Ces derniers ont observé une diminution de l'importance relative des polymorphonucléaires dans le décompte cellulaire des patients ayant eu une circulation extracorporelle en flot continu. Cette diminution était associée avec une plus grande consommation du complément et un taux d'infection respiratoire

plus élevé avec la perfusion en flot continu. Toutefois, ces deux observations faites dans des contextes différents et sur un total de seulement 25 patients sont loins d'être suffisantes afin de conclure à un effet négatif sur les fonctions immunitaires de l'instauration d'un flot continu systémique.

6.2.13. Impact sur les fonctions de coagulation

Fort de l'expérience clinique avec les valves métalliques et autres prothèses, nous savons que les corps étrangers, principalement métalliques, offrent des sites d'activation des cascades de coagulation. En rapport à ce sujet, le groupe de KOSTER et al. (2000) a évalué certains paramètres du système de coagulation de 12 patients qui recevaient l'implantation d'une pompe d'assistance en flot pulsé (NOVACOR) ou continu (DeBAKEY). La très grande majorité des paramètres mesurés et agissant sur la coagulation ou la formation étaient modifiés de manière équivalente dans les deux groupes, entraînant une situation prothrombogène.

6.2.14. Modélisations mathématiques de comparaison des flots pulsés et continus

Toutes ces expériences allaient dans le sens d'une différence entre les deux types de flot qui ne serait pas totalement expliquée par une différence nette de la perfusion et une oxygénation différente des tissus. Toutefois, il est nécessaire de s'attarder à ces questions actuellement sans réponse à savoir si toutes les anomalies que nous détectons lors d'un flot continu ne seraient pas uniquement secondaire au fait qu'il est nécessaire d'augmenter le débit de la pompe d'assistance ventriculaire en flot continu

comparativement à une pompe en flot pulsé. Cette hypothèse est celle du groupe de NOSE et al. (2000) qui proposent qu'une augmentation de 20 % du flot délivré par une pompe axiale en flot continu serait nécessaire afin d'éliminer les différences entre les effets physiologiques des flots continus et pulsés (NOSE et al., 1997).

Aussi, certains groupes ont proposé un index pulsé (GROSSI et al. 1985) afin de comparer la perfusion délivrée en flot pulsé et continu. Plus tard, cette méthode a été raffinée en ajoutant un nouvel indice, soit l'index de puissance pulsée (NOSE et al., 2000). UNDAR (2002), dans le contexte de recherches sur les modes de circulations extracorporelles propose une approche considérant l'énergie hémodynamiquement transmise (et non seulement la pression) par les diverses pompes et le cœur afin de comparer l'impact de ces divers modes. Il encourage aussi l'utilisation d'une formule donnant l'énergie équivalente pour une pression donnée. Ces index peuvent aussi être utiles dans le contexte de l'évaluation de la fraction d'éjection du ventricule gauche natif en analysant les faibles ondes de pulsations induites par le ventricule dans le contexte d'une pompe axiale (NAKATA et al., 1998).

6.3. MONTAGE DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les animaux qui seront dotés de l'assistance ventriculaire dans le présent protocole seront libres de maladie connue au moment de la prise en charge par le groupe de recherche et ne doivent pas avoir été soumis à aucune médication antérieurement.

Le projet est de déterminer l'impact d'un flot continu dans le contexte des essais chroniques d'une pompe d'assistance ventriculaire actuellement à l'essai sur le bovin. La durée prévue de l'expérience chronique d'implantation d'une pompe d'assistance ventriculaire en flot continu sur des veaux est de 3 mois. Le cadre initial du projet a été déterminé mais pourrait encore être sujet à modifications au cours des prochains mois. Il est actuellement prévu de former trois groupes de veaux :

- A) 6 veaux sains avec implantation d'une pompe placebo et des sondes de pression et de flot;
- B) 12 veaux sans insuffisance cardiaque avec implantation de la pompe à l'étude (flot continu);
- C) 12 veaux avec insuffisance cardiaque induite par électrostimulation cardiaque rapide avec implantation de la pompe à l'étude (flot continu).

6.3.1.1. Implantation de la pompe d'assistance ventriculaire

Nous allons reprendre seulement certaines parties du protocole opératoire d'implantation de la pompe qui peuvent nous être pertinentes. Ainsi, les animaux sont placés sous anesthésie générale et la pompe d'assistance ventriculaire est implantée par thoracotomie gauche. L'entrée de la pompe est reliée à l'apex du ventricule gauche et la sortie se retrouve au niveau de l'aorte thoracique descendante. Les capteurs de pression et de flot sont installés au moment de la chirurgie initiale. Les veaux seront ensuite

réveillés et transférés dans un centre de soins spécialisés pour acquisition continue des données hémodynamiques et pour le suivi postopératoire. Les veaux seront tous anticoagulés avec de l'héparine intraveineuse dans l'attente d'obtenir un INR entre 2 et 3 avec du coumadin. Les veaux recevront tous aussi de l'Aspirine 325 mg po DIE.

6.3.2. Déroulement du protocole

Tous les veaux auront une mesure des éléments que nous désirons suivre préalablement à la chirurgie d'implantation de la pompe ou du placebo. Cela excluant bien certainement les prélèvements pathologiques, sauf dans le cas de biopsies de parois vasculaires.

Les collectes urinaires seront faites sur des périodes de 12 ou de 24 heures via une sonde vésicale installée par voie urétrale base par une technique acquise grâce à l'aide de Dr Fecteau de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe. Cela, en raison de l'anatomie particulière des bovins femelles. Cette technique a été pratiquée avec succès lors des essais en aigu. Il est à préciser que l'installation d'une sonde urinaire par les voies naturelles est presque impossible chez le bovin mâle pour des raisons anatomiques. Suite aux prélèvements, la sonde sera gardée pour le jour de l'opération et le lendemain et retirée par la suite afin d'éviter des infections inutiles. La sonde devra être remplacée pour des nouvelles collectes à 6 semaines et à 12 semaines.

Une partie des prélèvements sanguins seront analysés immédiatement dans le contexte du suivi clinique des veaux. Nous pensons ici à une formule sanguine complète, une mesure de l'hémolyse plasmatique, un gaz artériel, le temps de prothrombine normalisé (INR) et certaines parties du bilan hépatique et rénal.

Les autres prélèvements sanguins nécessaires dans le cadre des suivis décrits ci-après seront centrifugés pour ne conserver que les plasmas (avec EDTA ou héparine) ou sérums (sans EDTA ou héparine). Ces échantillons ainsi que des échantillons urinaires seront congelés à basses températures pour analyses ultérieures. Seulement quelques échantillons des collectes urinaires seront conservés suite à la mesure des volumes des collectes. Il est à noter que nous conserverons quelques sérums et plasmas supplémentaires à basse température avenant que nous voulions faire de nouvelles mesures suite à la fin du protocole d'essai de pompes d'assistance ventriculaire en chronique.

6.3.3. Mesures hémodynamiques

Au cours de l'opération de mise en place de la pompe, une partie du suivi du pouls et de la pression artérielle sera fait via une canule artérielle en plus d'un enregistrement cardiaque à trois dérivations d'électrocardiogramme. Une quantité exhaustive de mesures hémodynamiques seront prises de manière continue à l'aide des capteurs de pression et de flot installés lors de l'installation de la pompe d'assistance ventriculaire. Aussi, dans le cadre des différences physiologiques probables entre les flots continus et

pulsés, il est nécessaire d'être en mesure de déterminer s'il y a redistribution du flot entre les divers organes. Effectivement, dans le cadre où la canule de sortie de la pompe sera placée au niveau de l'aorte thoracique, une grande partie de la perfusion cérébrale sera faite par une perfusion rétrograde de l'aorte thoracique descendante vers le tronc brachiocéphalique et les carotides. Il est donc pertinent de valider et de quantifier à l'aide de capteur de flot s'il y a une redistribution du flot entre les divers organes, notamment les reins et le cerveau. Cela, non seulement dans le cadre opératoire, mais aussi à l'occasion d'activités. De plus, il serait pertinent de déterminer à l'aide de capteurs de flot si la pompe d'assistance ventriculaire entraîne des différences dans la microcirculation locale, notamment au niveau rénal entre le cortex et la médulla.

6.3.3.1. Hémodynamie et fonction cardiaque

Initialement, nous avons essayé l'utilisation d'un cathéter de swan ganz via la veine jugulaire droite afin de faire le monitoring des données hémodynamiques cardiaques des veaux. Toutefois, en utilisant la technique de thermodilution comme il est nécessaire de le faire en utilisant un swan ganz, nous devons faire la moyenne de plusieurs prises de mesures afin de faire une moyenne des valeurs obtenues. Cette technique est classiquement utilisée dans de nombreuses publications, mais nous pensons devoir être plus précis. Nous avons à un certain moment envisagé une nouvelle technologie en essai sur l'animal au CHUS (PICCO). Cette dernière utilise l'analyse du contour de la courbe de pouls artériel pour déduire les variations du volume d'éjection et donc du débit cardiaque (REUTER et al., 2002) (PREISMAN et al., 1997). Toutefois, nous avons

rapidement dû abandonner l'idée parce que l'instauration d'un courant continu invalide le principe même de la méthode en annulant presque les ondes de pouls. Heureusement, les capteurs de pression et de flot mis en place lors de la chirurgie nous permettront de calculer les paramètres hémodynamiques cardiaques nécessaires. Aussi, des essais sont actuellement en cours à l'ICM afin d'être en mesure d'obtenir une mesure de la courbe du travail ventriculaire (pression en fonction du volume). Ainsi, ces mesures, jumelés à des échocardiographies seront suffisantes afin de caractériser les paramètres hémodynamiques cardiaques que nous désirons. Entre autres, nous pourrons ainsi effectuer le suivi de la fonction cardiaque des veaux et valider le rôle de la pompe d'assistance ventriculaire comme étant en mesure de laisser le temps aux cardiomyocytes de retrouver une partie de leurs fonctions. Notons ici qu'il est relativement bien établi que les cardiomyopathies secondaires aux tachyarythmies ont un potentiel de réversibilité (TRACY, 2003) (WALKER et al., 2004).

6.3.4. Mesures des paramètres physiologiques nous intéressant

Comme nous l'avons déjà présenté, nous aimerions faire le suivi de nombreuses fonctions dans le cadre des essais en flot pulsé et en flot continu. Nous introduisons ici les prélèvements que nous voulons considérer initialement dans le cadre des essais des pompes.

6.3.4.1. Autopsie et histologie générale

Après sacrifice, une autopsie immédiate sera faite principalement en ce qui a trait à la recherche de thromboembolie et d'infection au niveau macroscopique. Les anomalies étant investiguées plus en profondeur en histologie. Toutefois, en plus de cela, des prélèvements systématiques de certains organes pour observations histologiques futures seront aussi faits. Les organes d'intérêt sont le rein (artères rénales afférentes et efférentes, cortex et médulla), les glandes surrénales, le foie, les poumons, le cœur, la glande thyroïde, l'aorte, les coronaires, les carotides.

6.3.4.2. Structure des artères

Les structures des artères devront être évaluées pour deux raisons différentes lors d'études en microscopie optique et électronique. La première est afin de déterminer la présence ou non de changements compatibles avec de l'athérosclérose. Pour ce faire, nous nous baserons sur certaines publications qui ont étudié les artères avec des plaques en microscopie électronique (BALDWIN et al., 1997). La deuxième raison est afin de déterminer la présence de changements structuraux au niveau de la média, soit des cellules musculaires lisses, du collagène, de l'interstice ou de l'élastine. Les artères à prélever à l'occasion de ces expériences sont l'aorte, les artères coronaires et rénale et les carotides qui devront être fixées dans des aldéhydes.

6.3.4.3. Changement au niveau de l'endothélium

Comme nous l'avons mentionné, les cellules endothéliales s'orientent en fonction de la présence d'un flot. De plus, la présence d'un flot pulsé en comparaison à un flot continu entraîne des changements en ce qui concerne la structure même des cellules. La première étape de l'exploration de cet aspect serait d'utiliser une technique décrite au chapitre 3 pour mettre en évidence le contour des cellules endothéliales. Nous pourrions aussi, à l'aide de techniques décrites aussi dans le chapitre 3, étudier le nombre de cellules en mitose et en processus de mort cellulaire. Finalement, nous pourrions envisager de vérifier la distribution de la cadherine endothéliale. Les artères potentiellement techniquement accessibles à l'occasion de cette technique sont les carotides et les coronaires.

6.3.4.4. Réactivité vasculaire

Au sacrifice, les artères carotidiennes et coronaires pourraient être prélevées et montées en anneaux pour être ensuite soumises à un protocole standard de réactivité vasculaire. Les agents vasoactifs à tester initialement seraient le KCl, la phényléphrine, l'acétylcholine et l'angiotensine II.

6.3.4.5. Mesures reliées à la fonction rénale

Il est à noter que les modèles animaux sont probablement les meilleurs afin d'évaluer de manière adéquate les changements induits par un flot continu au niveau rénal.

Effectivement, les patients humains ayant actuellement des pompes d'assistance ventriculaire ont souvent d'autres conditions pouvant avoir un impact physiologique au niveau rénal (insuffisance rénale, diurétiques, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), état de bas débit chronique, sténose des artères rénales, ...).

Les principaux facteurs affectant les reins chez les animaux de l'expérience, en plus de la pompe en tant que telle, sont les instabilités hémodynamiques reliées à la procédure, l'hémolyse intravasculaire reliée à la pompe et les médicaments administrés. Les mesures reliées à la fonction rénale devront être faites dans le contexte le plus stable possible à l'occasion de ces expériences en chronique. Ainsi, nous aimerions faire les prélèvements nécessaires aux divers calculs de clairance et d'excrétion rénales avant, et après l'implantation de l'assistance ventriculaire mécanique. Cela, selon les aménagements possibles en concordance avec l'évolution des essais en cours.

Nous pouvons mesurer la filtration glomérulaire et le flot plasmatique rénal en suivant un protocole semblable à celui de LORTIE et al. (1992). C'est-à-dire qu'un bolus d'inuline (2,0 mg/kg) et de PAH (0,4 mg/kg) sera administré et sera suivi par une perfusion continue des deux substances diluées dans du NaCl 0,9 % (Inuline 0,03 mg/kg/min., PAH 0,006 mg/kg/min.) afin de maintenir des taux constants dans le plasma. Ces perfusions étant nécessaires pour la durée des collectes. Il est à préciser que la seule mesure maintenant disponible facilement et simplement afin de mesurer l'inuline est la mesure de l'inuline radioactive. Il n'est plus possible d'effectuer les

mesures d'inuline à Montréal, à Sherbrooke ou à Québec en utilisant les anciennes techniques par fluorométrie (VUREK et PEGRAM, 1966) et spectrophotométrie (HEYROVSKY, 1956) pour des raisons techniques. Si nous ne voulons pas utiliser l'inuline radioactive, il est possible d'utiliser une perfusion de créatinine exogène (JOBIN et al., 1977) afin d'estimer le taux de filtration glomérulaire. Il est entendu qu'avec la perfusion exogène de créatinine, nous sommes soumis à une certaine erreur secondaire au fait de la production de créatinine endogène. Dans le cas où nous ne pourrions pas utiliser de perfusion à aucun moment du protocole, il serait possible d'obtenir une évaluation du taux de filtration glomérulaire à partir de la créatinine et de l'urée plasmatique (selon une approximation mathématique) ou bien à l'aide d'une collecte urinaire.

En plus de la créatinine plasmatique, de l'urée plasmatique et du gaz artériel qui seront prélevés de manière routinière à l'occasion des essais cliniques, d'autres valeurs seront nécessaires afin de compléter l'évaluation rénale. Ainsi, en plus de la mesure des volumes urinaires lors des collectes, il sera nécessaire de mesurer dans l'urine l'urée et la créatinine. De plus, il sera nécessaire de mesurer dans le sang et dans l'urine les éléments suivants : acide urique, électrolytes (Na, K, Cl, P, Ca, Mg), protéines, PAH et inuline (si indiqué). Nous ferons aussi un sédiment urinaire et une analyse d'urine.

6.3.4.6. Fonction de l'axe rénine-aldostérone-angiotensine

Nous n'avons pas tenté de tester si les tests disponibles au laboratoire clinique du CHUS étaient en mesure de reconnaître les composantes de l'axe rénine-aldostérone-angiotensine. Toutefois, il y a de fortes chances que ce serait le cas selon les informations contenues dans la publication de CARTLEDGE et LAWSON (2000). Il est à préciser que dans le cas des composantes de l'axe rénine-aldostérone-angiotensine, il n'y a pas de système disponible commercialement pour le moment destiné spécifiquement pour l'espèce bovine.

6.3.4.7. Fonctions reliées à la thyroïde

Nous avons fait un essai au laboratoire clinique du CHUS afin de savoir s'il y avait une réaction croisée entre les hormones thyroïdiennes humaines et bovines. Nous sommes en mesure de mesurer la T₄ libre et la T₃ à l'aide des appareils en clinique du CHUS (Système ADVIA Centaur). Toutefois, la TSH est indétectable sur 2 bovins consécutifs et il faudra donc s'en remettre à un dispositif disponible commercialement pour le dosage de la TSH bovine. Ce système est disponible commercialement. Notons qu'en raison des besoins de l'industrie reliée à l'élevage des bovins, certaines compagnies, telles que Endocrine Technologies Inc. (É.-U.), disposent de méthodes de dosage des fonctions endocriniennes. Cela, principalement pour ce qui a trait aux fonctions sexuelles, mais aussi thyroïdiennes, de l'hormone de croissance et du cortisol. Il est à préciser qu'il pourrait être intéressant de doser les hormones de d'autres glandes qui ne

devraient théoriquement pas être influencées par les changements hémodynamiques induits par un flot continu. Nous pouvons penser ici aux glandes parathyroïdes qui relâche l'hormone PTH impliquée dans le métabolisme phosphocalcique.

6.3.4.8. Fonctions sexuelles

La testostérone bovine est détectable à partir des essais humains disponibles au laboratoire clinique de biochimie au CHUS (Testosterone RIA, Diagnostic Systems Laboratories, Inc.). Nous n'avons pas tenté de doser les autres hormones sexuelles.

6.3.4.9. Fonctions surrénaliennes

L'ACTH est détectable à partir des essais humains disponibles au laboratoire clinique de biochimie du CHUS (ACTH IRMA, DIASORIN, Minnesota, É.-U.). Ce n'est toutefois pas le cas du cortisol qui est indétectable avec les dispositifs disponibles pour reconnaître le cortisol humain. Nous devons donc aussi prendre une technique disponible commercialement comme par exemple chez Endocrine technology Inc. (É.-U.).

6.3.4.10. Vasopressine

En ce qui a trait à la vasopressine, peu de laboratoires s'intéressent à son dosage. Nous avons contacté le Dr Daniel BICHET, Département de physiologie de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal afin d'envisager la possibilité de doser la vasopressine dans son laboratoire. Les prélèvements doivent être faits dans des tubes

identiques à ceux pour les formules sanguines complètes, c'est-à-dire avec de l'EDTA, pour ensuite effectuer une centrifugation à 4°C à 1000g pour 20 minutes et prélever le surnageant (et uniquement le surnageant) qui sera conservé à -20°C ou moins.

6.3.4.11. Mesures en ce qui concerne le suivi au niveau hépatique

Les pièces prélevées pour analyses histologiques en pathologie seront jumelées avec les prélèvements sanguins de routine du bilan hépatique (AST, ALT, phosphatase alcaline, bilirubine totale et conjuguée, LDH, albumine, INR) avec comme objectif de déterminer si l'instauration d'un flot continu entraîne des modifications au niveau hépatique.

6.3.5. Autres avenues de recherche à considérer

Ces premiers protocoles seraient probablement les plus simples à réaliser dans l'immédiat et pourraient fournir des informations intéressantes. Pour la suite, nous pourrions envisager faire de nombreux autres expérimentations et mesures. Les plus simples consisteraient à utiliser les sérums et plasmas conservés et de mesurer plusieurs médiateurs à déterminer. Par exemple, dans ce cadre, nous pourrions songer à mesurer certaines protéines qui sont des marqueurs de dommages tissulaires spécifiques (cerveau, globules blancs,...). D'autres sujets déjà abordés précédemment seraient aussi à étudier considérant l'impact clinique possible. Entre autres, il s'agit de la correction des anomalies de la dystrophine et du fonctionnement des systèmes d'autorégulation lors d'un flot continu. Dans le même cadre, plusieurs adaptations neurohumorales (COLUCCI, 2003) en plus d'une induction de l'apoptose (NARULA, 2003) sont

présentes en insuffisance cardiaque et il serait intéressant de suivre ces paramètres à l'occasion des essais de pompe.

Un autre aspect que nous aimerions évaluer dans l'avenir et qui aurait un impact réel clinique serait l'évaluation des fonctions immunitaires. Ces dernières pourraient être évaluées de manières initiales selon les méthodes proposées en clinique par BONILLA (2003). À l'occasion de nos expériences, les parties pertinentes de ses recommandations seraient la formule sanguine complète et la différentielle des globules blancs. Les fonctions spécifiques de l'immunité humorale et cellulaire seraient à être traitées dans un deuxième temps. De même, comme nous savons que l'apoptose des cellules T est induite dans la plupart des expérimentations *in vitro* peu importe le protocole (ANKERSMIT et al., 2002), l'analyse de cette situation serait à prévoir considérant l'implantation d'un corps étranger d'importance. Les méthodes de mesure de ces fonctions sont commercialement disponibles en ce qui a trait à l'humain mais pas en ce qui a trait aux bovins. Finalement, nous pourrions tester l'érythropoïèse de manière générale en soumettant les animaux à la fin du protocole à une aspiration et biopsie de moelle. Le problème en ce qui concerne ce prélèvement est de trouver quelqu'un pour en faire l'analyse.

6.4. DISCUSSION

Le protocole proposé subira quelques modifications avant d'être applicable à l'occasion des essais de pompes d'assistance ventriculaire, mais les grands plans de la recherche et les principales hypothèses sont actuellement posés. De plus, des discussions et questionnements sont actuellement en cours concernant les groupes de l'étude puisque des trois groupes de bovins proposés, aucun ne subit l'implantation d'une pompe d'assistance ventriculaire avec flot pulsé qui serait un groupe contrôle important à l'occasion de nos expériences. Toutefois, tels que le problème a été plusieurs fois rapporté dans le cadre des comparaisons antérieures en flot continu et en flot pulsé, il résidera encore le problème de savoir si le flot délivré par l'assistance en flot pulsé est équivalent à celui délivré en flot continu et si les différences sont le fait de la différence du mode de flot ou bien de l'intensité du flot délivré. Les conclusions semblent tendre vers le fait de ne pas mettre de groupe contrôle avec une assistance ventriculaire en flot pulsé. Cela, dans le contexte où l'importance pour les essais des pompes, au-dessus du fait d'étudier la différence entre un flot continu ou pulsé, est de démontrer que le flot délivré par la pompe en développement permet d'obtenir une physiologie qui est acceptable. Cela, afin de procéder à l'implantation à long terme de l'appareil sur des êtres humains souffrant d'insuffisance cardiaque.

CONCLUSION

7. CONCLUSION

Sans reprendre les conclusions et discussions de chacun des chapitres, nous pouvons affirmer que nous avons été en mesure de rejoindre une partie des objectifs que nous nous étions fixés au départ en nous adaptant graduellement selon les résultats obtenus. Certes, le résultat est différent de celui auquel nous nous attendions au départ, mais nous avons de manière avantageuse utilisé nos connaissances des mathématiques et les progrès de l'ingénierie afin de développer de nouvelles avenues de recherche. Cependant, les mathématiques et l'ingénierie ne sont pas d'une grande aide lorsqu'il est question d'éduquer et de modifier les habitudes de vie de la population qui souvent sont à la base de nombreuses pathologies cardiovasculaires.

Aussi, comme cela est fréquent à l'occasion de projets de recherche, un rapport d'étape, comme se veut bien souvent un mémoire de maîtrise, laisse souvent beaucoup plus de nouvelles questions à répondre que celles auxquelles il trouve réponse.

REMERCIEMENTS

8. REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mes directeurs de recherche, soit Dr Gérard E. Plante, Université de Sherbrooke, et Pr André Garon, École Polytechnique de Montréal, pour le support et l'accueil au sein de l'équipe de leurs laboratoires.

Aussi, je voudrais remercier les membres du jury qui ont accepté la tâche d'effectuer la révision de ce manuscrit. Le jury étant constitué, en plus de mes directeurs de recherche, du Pr Alain Cadieux, Département de pharmacologie, et du Dr Félix Ayala-Paredes, Département de cardiologie.

Je voudrais aussi remercier certains professeurs de l'Université de Montréal qui m'ont prodigué de judicieux conseils, soit le Pr Moise Bendayan du Département de pathologie et de biologie cellulaire et le Dr Gilles Fecteau de la Faculté de médecine vétérinaire. De plus, il est nécessaire de remercier les Dr Raymond Lepage et Dr Marc Letellier du Service de biochimie du CHUS pour leurs contributions.

Bien certainement, je ne pourrais passer sous silence l'apport extrêmement important ainsi que le soutien des attachés de recherche et des techniciennes, techniciens et assistants de recherche qui ont permis qu'une grande partie du travail soit réalisé ;

Mme Angèle Tremblay, Laboratoire Dr GE Plante, Université de Sherbrooke

M. Jean-Marie Béland, Département de Génie mécanique, École Polytechnique de Montréal

M. Charles Bertrand, Microscopie électronique, Université de Sherbrooke

M. Denis Martel, Microscopie Électronique, Université de Sherbrooke

M. Pierre Thai, Attaché de recherche du Dr M. Carrier, Institut de cardiologie de Montréal

M. Léonid Volkov, Microscopie confocale, Centre de recherche clinique de Sherbrooke

Pour terminer, je ne voudrais pas passer sous silence la contribution et/ou le support de certains étudiants à mes projets :

M. Charles Cuerrier, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Mme Julie Grant, Département de Génie Mécanique, École Polytechnique de Montréal

Mme. Gabrielle Gendron, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

M. Antoine Désilets, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Dr François Lamontagne, Département de médecine interne, Université de Sherbrooke

M. Guillaume Lansac, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

M. Yves Martin, Département de génie chimique, Université de Sherbrooke

Mme. Isabelle Renaud, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

M. José Urquiza, Département de mathématique, École Polytechnique de Montréal

BIBLIOGRAPHIE

9. BIBLIOGRAPHIE

ABRAMOV, D., TAMARIZ, M., SERRICK, C., SHARP, E., NOEL, D., HARWOOD, S., CHRISTAKIS, G.T., GOLDMAN, B.S. (2003) The influence of cardiopulmonary bypass flow characteristics on the clinical outcome of 1820 coronary bypass patients. *Can. J. Cardiol.* **19 (3)** : 237-243.

ADAMSON, R.H. (1990) Permeability of frog mesenteric capillaries after partial pronase digestion of the endothelial glycocalyx. *J. Physiol.* **428** : 1-13.

ALBALADEJO, P., BOUAZIZ, H., DURIEZ, M., GOHLKE, P., LEVY, B., SAFAR, M.E., BENETOS, A. (1994) Angiotensine-converting enzyme inhibition prevents the increase in aortic collagen in rat. *Hypertension* **23** : 74-82.

ALBALADEJO, P., COPIE, X., BOUTOUYRIE, P., LALOUX, B. et al. (2001) Heart rate, arterial stiffness, and wave reflexions in paced patients. *Hypertension* **38 (4)** : 949-952.

ALLEN, G.S., MURRAY, K.D., OLSEN, D.B. (1997) The importance of pulsatile and nonpulsatile flow in the design of blood pumps. *Artificial Organs* **21 (8)** : 922-928.

ANKERSMIT, H.J., WIESELTHALER, G., MOSER, B., GERLITZ, S., ROTH, G., BOLTZ-NITULESCU, G., WOLNER, E. (2002) Transitory immunologic response after implantation of the DeBakey VAD continuous-axial-flow pump. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **123 (3)** : 557-561.

ANSTEDT, M.P., TEDDER, M., HEGDE, S.S., PEREZ-TAMAYO, R.A., CRAIN, B.J., KHIAN, H.V.L., ABDEL-ALEEM, S., WHITE, W.D., LOWE, J.E. (1993) Pulsatile versus nonpulsatile reperfusion improves cerebral blood flow after cardiac arrest. *Annals of Thoracic Surgery* **56 (3)** : 453-461.

ASMAR, R.G., LONDON, G.M., O'ROURKE, M.E., SAFAR, M.E. (2001) Improvement in blood pressure, arterial stiffness and wave reflexions with a very-low-dose Perindopril/Indapamide combination in hypertensive patient: A comparison with Atenolol. *Hypertension* **38 (4)** : 922-926.

ATKINSON, J. (1999) Arterial calcification. Mechanisms, consequences and animal models. *Path. Biol.* **47 (7)** : 677-684.

AUKLAND, K., REED, R.K. (1993) Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiological Reviews.* **73 (1)** : 1-78.

- AVOLIO, A. (1995) Genetic and environmental factors in the function and structure of the arterial wall. *Hypertension* **26** : 34-37.
- AVOLIO, A., JONES, D., TAFAZZOLI-SHADPOUR, M. (1998) Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension* **32** (1) : 170-5.
- BALDWIN, A.L., WILSON, L.M., GRADUS-PIZLO, I., WILENSKY, R., MARCH, K. (1997) Effect of atherosclerosis on transmural convection and arterial ultrastructure : Implication for local intravascular drug delivery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **17** : 3365-3375.
- BALDWIN, A., WILSON, L.M., McGUIRE, B.J. (date de publication pas disponible) Effect of charge on the distribution and retention of macromolecules in the artery wall. (Résumé) Depts of physiology and Biomedical Engineering, University of Arizona, Tucson, Arizona, É.-U.
- BALDWIN, A.L., WINLOVE, C.P. (1984) Effect of perfusate composition on binding of Rutherfordium Red and gold colloid to glycocalyx of rabbit aortic endothelium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **32** (3) : 259-266.

- BANK, A.J. (1999) Intravascular ultrasound studies of arterial elastic mechanics. *Path. Biol.* **47 (7)** : 731-737.
- BAZZONI, G., DEJANA, E. (2004) Endothelial cell-to-cell junctions : molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* **84** : 869-901.
- BAYER, I.M., CANIGGIA, I., ADAMSON, S.L., LANGILLE, B.L. (2002) Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum. *Cell Tissue Res.* **307** : 303-313.
- BELMIN, J., CORMAN, B., MERVAL, R., TEDGUI, A. (1993) Age-related changes in endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta. *Am. J. Physiol.* **264** : H679-685.
- BENDAYAN, M. (1980) Use of the protein A-gold technique for the morphological study of vascular permeability. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **28 (11)** : 1251-1254.
- BENDAYAN, M. (1984) Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry : Methods, applications, and limitations. *Journal of Electron Microscopy Technique* **1** : 243-270.

- BENDAYAN, M. (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Progress in histochemistry and cytochemistry* **29** (4) : 1-163.
- BENDAYAN, M. (2000) A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology. *Biotechnic and Histochemistry* **75** (3) : 203-242.
- BENDAYAN, M. (2002) Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability. *Microsc. Res. Tech.* **57** : 327-349.
- BENDAYAN, M., GINGRAS, D., CHAREST, P. (1986) Distribution of endogenous albumin in the glomerular wall of streptozocin-induced diabetic rats as revealed by high-resolution immunocytochemistry. *Diabetologia* **29** : 868-875.
- BENDAYAN, M., LONDONO, I., (1996) Reabsorption of native and glycated albumin by renal proximal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **271** : F261-F268.
- BENDAYAN, M., NANCI, A., KAN, F.W.K. (1987) Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **35** : 983-996.

- BENDAYAN, M., RASIO, E.A. (1996) Transport of insulin and albumin by the microvascular endothelium of the rete mirabile. *Journal of Cell Science* **109** : 1857-1864.
- BENDAYAN, M., RASIO, E.A. (1997) Évidence of a tubular system for transendothelial transport in arterial capillaries of the rete mirabile. *J. Histochem. Cytochem.* **45** : 1365-1378.
- BENETOS, A. et al.(1996) Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type I receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* **94** : 698-703.
- BENETOS, A., SAFAR, M.E. (1996) Aortic collagen, aortic stiffness, and AT1 receptors in experimental and human hypertension. *Can. J. Pharmacol.* **74** : 862-866.
- BENETOS, A., SAFAR, M., RUDNICH, A. et al. (1997) Pulse pressure : a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension* **30** : 1410-1415.
- BENETOS, A., TOPOUCHIAN, J., RICARD, S., GAUTHIER, S., BONNARDEAUX, A., ASMAR, R., POIRIER, O., SOUBRIER, F., SAFAR, M.E., CAMBIEN, F.

(1995) Influence of angiotensine II type 1 receptor polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* **26** : 44-47.

BENGA, G., POP, V.I., POPESCU, O., BORZA, V. (1990) On mesuring the diffusional water permeability of human red blood cells and ghosts by nuclear magnetic resonance. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **21** : 87-102.

BERESEWICZ, A., CZARNOWSKA, E., MACZEWSKI, M. (1998) Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelial glycocalyx disruption in the postischemic guinea-pig hearts. *Molecular et Cellular Biochemistry* **186 (1-2)** : 87-97.

BETTINI, R., MAINO, C., GORINI, M. (2003) Effectiveness of Mesoglycan in the prevention of cerebral ischemia (résumé traduit de l'italien). *Clinica terapeutica* **154 (1)** : 13-16.

BIELAWSKI, J. (1990) Two types of haemolytic activity of detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* **1035** : 214-217.

BINGLEY, J.A., HAYWARD, I.P., CAMPBELL, J.H., CAMPBELL, G.R. (1998) Arterial heparan sulfate proteoglycans inhibit vascular smooth muscle cell

proliferation and phenotype change in vitro and neointimal formation in vivo.
Journal of Vascular Surgery **28 (2)** : 308-318.

BLACHER, J., GUERIN, A.P., PANNIER, B., MARCHAIS, S.J., LONDON, G.M.
(2001) Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end stage
renal disease. Hypertension **38 (4)** : 938-942.

BONILLA, F.A. (2003) Laboratory evaluation of the immune system. Dans Up to Date
12.1 www.Uptodate.com

BORTOLOTTO, L.A., SAFAR, M.E., BILLAUD, E., LACROIX, C., ASMAR, R.,
LONDON, G.M., BLACHER, J. (1999) Plasma homocysteine, aortic stiffness, and renal
function in hypertensive patients. Hypertension **34 (4, part 2)** : 837-842.

BRANDES, H., ALBES, J.M., CONZELMANN, A., WEHRMANN, M., ZIEMER, G.
(2002) Comparison of pulsatile and nonpulsatile perfusion of the lung in an
extracorporeal large animal model. European Surgical Research **34 (4)** : 321-329.

BREITHAUPT-GRÖGLER, K., BELZ, G.G. (1999) Epidemiology of the arterial
stiffness. Path. Biol. **47 (6)** : 604-613.

BERGEL, D.H. Cardiovascular fluid dynamics. Academic Press, London and New York (1972) p.105-139.

BRUNEAU, N., BENDAYAN, M., GINGRAS, D., GHITESCU, L., LEVY, E., LOMBARDO, D. (2003) Circulating bile salt-dependent lipase originates from the pancreas via intestinal transcytosis. *Gastroenterology* **124** : 470-480.

BUCKLEY, M.S., WASHINGTON, S., LAURENT, C., ERICKSON, D.R., BHAVANANDAN, V.P. (1996) Characterization and immunohistochemical localization of the glycoconjugates of the rabbit bladder mucosa. *Archives of biochemistry and biophysics* **330** (1) 163-173.

BUCKWALTER, J.A., ROSENBERG, L.C. (1982) Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry* **257** (16) : 9830-9839.

BUKET, S., ALAYUNT, A., OZBARAN, M., HAMULU, A., DISCIGIL, B., CETINDAG, B., OZKILIC, H., BALKAN, Z., BILKAY, O., DURMAZ, I. (1994) Effect of pulsatile flow during cardiopulmonary bypass on thyroid hormone metabolism. *Ann. Thorac. Surg.* **58** : 93-96.

CAMPBELL, G.J., ROACH, M.R. (1981) Fenestrations in the internal elastic lamina at bifurcations of human cerebral arteries. *Stroke* **12** (4) : 489-496.

CARTLEDGE, S., LAWSON, N. (2000) Aldosterone and renin measurements. *Ann. Clin. Biochem.* **37** : 262-278.

CHAJARA, A., LEVESQUE, H., COUREL, M.N., CHAUZY, C., MAINGONNAT, C., BERTRAND, P., DELPHEH, B. (1996) Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta. *Atherosclerosis* **125** (2) : 193-207.

CHANDRAN, K.B., Cardiovascular biomechanics, New York University biomedical engineering series, New York and London (1992) p. 95-137.

CHEN, Y.-L., JAN, K.-M., LIN, H.-S., CHIEN, S. (1995) Ultrastructure studies on macromolecular permeability in relation to endothelial cell turnover. *Atherosclerosis* **118** : 89-104.

CHEN, Y.-L., JAN, K.-M., LIN, H.-S., CHIEN, S. (1997) Relationship between endothelial cell turnover and permeability to horseradish peroxidase. *Atherosclerosis* **133** : 7-14.

CHEUNG, A.K., ALFORD, M.F., WILSON, M.M., LEYPOLDT, J.K., HENDERSON, L.W. (1983) Urea movement across erythrocyte membrane during artificial kidney treatment. *Kidney International* **23** : 866-869.

- CHEVALIER, L. Exercices et problèmes corrigés de mécanique des systèmes et des milieux déformables. Ellipses, Paris, France (1997) 416 pages.
- CHIEN, S., LIN, S.J., WEINBAUM, S., LEE, M.M., JAN, K.M. (1988) The role of arterial endothelial cell mitosis in macromolecular permeability. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **242** : 59-73.
- CHOW, G., ROBERTS, I.G., EDWARDS, A.D., LLOYD-THOMAS, A., WADE, A., ELLIOT, M.J., KIRKHAM, F.J. (1997) The relation between pump flow rate and pulsatility on cerebral hemodynamics during pediatric cardiopulmonary bypass. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **114 (4)** : 568-577.
- CHUANG, P.T., CHEN, H.J., LIN, S.J., JAN, K.M., LEE, M.M.L., CHIEN, S. (1990) Macromolecular transport across arterial and venous endothelium in rats. Studies with evan blue-albumin and horseradish peroxidase. *Arteriosclerosis* **1990 (10)** : 188-197.
- COLTON, C.K., LOWRIE, E.G. Hemodialysis : physical principles and technical considerations. dans Brenner, B.M., Rector, F.C.Jr. (Eds) *The Kidney*. 2nd edition, vol 2, Saunders, NY, É.-U. 1981 p. 2425-2489.

COLUCCI, W.S. (2004) Overview of the therapy of heart failure due to systolic dysfunction. Dans Up to Date 12.1 www.Uptodate.com

COLUCCI, W.S. (2003) Pathophysiology of heart failure : Neurohumoral adaptations. Dans Up to Date 12.1 www.Uptodate.com

COLUCCI, W.S. (2003) Predictors of survival in heart failure due to systolic dysfunction. Dans Up to Date 12.1 www.Uptodate.com

CONSTANTINESCU, A.A., VINK, H., SPAAN, J.A.E. (2001) Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell glycocalyx by oxidized LDL. Am. J. Physiol. **280** : H1051-H1057.

CURMI, P., JUAN, L., TEDGUI, A. (1990) Effect of transmural pressure on low density lipoprotein and albumin transport and distribution across the intact arterial wall. Circulation research **66** : 1692-1702.

DALTON, M.L., McCARTY, R.T., WOODWARD, K.E., BARILA, T.G. (1965) The army artificial heart pump. II. Comparison of pulsatile and nonpulsatile flow. Surgery **58 (5)** : 840-845.

DAMIANO, E.R., STACE, T.M. (2002) An mechano-electrochemical model of radial deformation of the capillary glycocalyx. *Biophysical Journal* **82** : 1153-1175.

DANSER, A.H.J., KONING, M.M.G., ADMIRAAL, P.J.J., DERKX, F.H.M., VERDOUW, P.D., SCHALEKAMP, M.A.D.H. (1992) Metabolism of angiotensin I by different tissues in the intact animal. *Am. J. Physiol.* **263** : H418-H428.

DAVIES, J.I., STRUTHERS, A.D. (2003) Pulse wave analysis and pulse wave velocity : A critical review of their strengths and weaknesses. *Journal of hypertension* **21** : 463-472.

DELFOUR, M.C., GARON, A., LONGO, V. (à paraître) Modeling and design of coated stents to optimize the effect of the dose. *SIAM J. Appl. Math.*

DESJARDINS, C., DULING, B.R. (1990) Heparinase treatment suggest a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am. J. Physiol.* **258** : H647-H654.

DIETRICH, C.P., NADER, H.B., STRAUS, A.H. (1983) Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111** : 865-871.

DIETRICH, C.P., TERSARIOL, I.L.S., TOMA, L., MORAES, C.T., PORCIONATTO, M.A., OLIVEIRA, F.W., NADER, H.B. (1998) Sequencing of heparan sulfate : Identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfates from different origins. *Cell. Mol. Biol.* **44** : 417-429.

DIVONIN, A.L., MISHCHENKO, B.P., LOGINOVA, L.I., MIKHAÏLOVA, M.L. (1991) Changes in the liver circulation and kidney function during pulsatile and non-pulsatile perfusion. (résumé traduit du russe) *Anesteziologiya i Reanimatologiya* **(3)** : 36-40.

DIVONIN, A.L., NISNEVICH, E.D. (1990) Study of peripheral blood circulation during continuous and pulsatile perfusion based on the data of transcutaneous pO₂ and pCO₂ monitoring. (résumé traduit du russe) *Anesteziologiya i Reanimatologiya* **(2)** : 12-16.

DOMANSKI, M., NORMAN, J., WOLZ, M., MITCHELL, G., PFEFFER, M. (2001) Cardiovascular risk assessment using pulse pressure in the first national health and nutrition examination survey (NHANES I). *Hypertension* **38 (4)** : 793-797.

DOMANSKI, M., MITCHELL, G., PFEFFER, M., NEATON, J., NORMAN, J., SVENDSEN, K., GRIMM, R., COHEN, J., STAMLER, (2002) Pulse pressure and

cardiovascular disease-related mortality : Follow-up study of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* **287** (20) : 2677-2683.

DOMINO, F.J., KAPLAN, N.M. (2003) Overview of hypertension. Dans Up to date 12.11 www.Uptodate.com

DRIESSEN, J.J., DHAESE, H., FRANSEN, G., VERRELST, P., RONDELEZ, L., GEVAERT, L., VAN BECALAERE, M., SCHELSTRAETE, E. (1995) Pulsatile compared with nonpulsatile perfusion using a centrifugal pump for cardiopulmonary bypass during coronary artery bypass grafting. Effect on systemic haemodynamics, oxygenation, and inflammatory response parameters. *Perfusion* **10** (1) : 3-12.

DUMONTET, H., DUVAUT, G., LÉNÉ, F., MULLER, P., TURBÉ, N. Exercices de mécanique des milieux continus. Masson, Paris, France (1994).

DUNCAN, L.E., CORNFIELD, J., BUCK, K. (1962) The effect of blood pressure on the passage of labeled plasma albumin into canine aortic wall. *Journal of clinical investigation* **41** (7) : 1537-1545.

DVORAK, A.M., FENG, D. (2001) The vésiculo-vacuolar organelle (VVO) : a new endothelial cell permeability organelle. *J. Histochem. Cytochem.* **49** : 419-431.

- ET-TAOUIL, K., SAKAR, M., PLANTE, G.E. (2003) Mechanisms and consequences of large artery rigidity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81** : 205-211.
- ET-TAOUIL, K., SCHIAVI, P., LÉVY, B.I., PLANTE, G.E. (2001) Sodium intake, large artery stiffness, and proteoglycans in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **38** : 1172.
- ETTENSON, D.S., KOO, E.W., JANUZZI, J.L., EDELMAN, E.R. (2000) Endothelial heparan sulfate is necessary but not sufficient for control of vascular smooth muscle cell growth. *Journal of Cellular Physiology* **184** (1) : 93-100.
- FOLKOW, B. (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological reviews* **62**(2) : 347-504.
- FORTIER, J.C., HOULD, R., *Histotechnologie, théorie et procédés*. Centre collégial de développement de matériel didactique (CCDMD). Montréal, Québec. (2003) p. 335-340.
- FOURNIER, R.L. *Basic transport phenomena in biomedical engineering*. Edwards Brothers, Lillington, N.C., É.-U. (1999) p. 148-154.

- FRANK, J.S., FOGELMAN, A.M. (1989) Ultrastructure of the intima in WHHL and cholesterol-fed rabbit aortas prepared by ultra-rapid freezing-etching. *J. Lipid Res.* **30** : 967-978.
- FRANTZEN, F., GRIMSRUD, K., HEGGLI, D.-E., SUNDREHAGEN, E. (1997) Selective precipitation of human hemoglobin by organic solvents and metal cations. *Hemoglobin* **21(2)** : 155-172.
- FEDERICO, A., BATTISTI, C., MANNESCHI, L., GAGGELLI, E., TASSINI, M., VALENSIN, G., VIVI, A. (1996) Amiodarone affects membrane water permeability properties of human erythrocytes and rat mitochondria. *European Journal of Pharmacology* **304** : 237-241.
- FLÜGGE, W. *Tensor analysis and continuum mechanics*. Springer-Verlag Berlin – Heidelberg, Allemagne (1972) 207 pages.
- FORMAGGIA, L., GERBEAU, J.-F., NOBILE, F., QUARTERONI, A. (2001) On the coupling of 3D and 1D Navier-Stokes equations for flow problems in compliant vessels. *Comput. Methods Appl. Mech. Engrg.* **191** : 561-582.

- FORSTER, B.A., WEINBERG, P.D. (1997) Changes with age in the influence of endogenous nitric oxide on transport properties of the rabbit aortic wall near branches. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **17** : 1361-1368.
- FRANKLIN, S.S. (1999) Cardiovascular risk related to increased diastolic, systolic and pulse pressure. *Path. Biol.* **47 (6)** : 594-603.
- FRY, D.L. (1983) Effect of pressure and stirring on in vitro aortic transmural ¹²⁵I-albumin transport. *Am. J. Physiol.* **245** : H977-H991.
- FU, B.M., CHEN, W., XUE, Q. (2001) A model for the charges effect of surface glycocalyx on microvessel solute permeability. *BED* **50** : 179-180.
- FUNG, Y.C. *Biomechanics*. Springer-Verlag NY, É.-U. (1981) p. 196-287.
- GABALDON, M. (1987) Methodological approaches for the study of the aortic endothelium of the rat. *Atherosclerosis* **65** : 139-149.
- GENEST, J. (2001) Progress in hypertension research. *Hypertension* **38 (4)** : 13-18.

GHITESCU, L. BENDAYAN, M. (1992) Hapten-targged plasma proteins as immunocytochemical probes for the study of vascular permeability. *Microsc. Res. Techn.* **22** : 392-401.

GHITESCU, L. BENDAYAN, M. (1992) Transendothelial transport of serum albumin : A quantitative immunocytochemical study. *The Journal of Cell Biology* **117** (4) : 745-755.

GHITESCU, L., DESJARDINS, M., BENDAYAN, M. (1992) Immunocytochemical study of glomerular permeability to anionic, neutral and cationic albumins. *Kidney International* **42** : 25-32.

GIANNATTASIO, C., FAILLA, M., CALCHERA, I., GRIECO, N., SCANDOLA, L., GRAPPIOLO, A., MANCIA, G. (1999) Pharmacological improvement of large arteries properties. *Path. Biol.* **47** (7) : 744-751.

GIRERD, X., LAURENT, S., PANNIER, B., ASMAR, R., SAFAR, M. (1991) Arterial distensibility and left ventricular hypertrophy in patients with sustained essential hypertension. *Am. H. J.* **122** : 1210-1214.

GOODMAN, T.A., GERARD, D.F., BERNSTEIN, E.F., DILLEY, R.B. (1976) The effects of pulseless perfusion on the distribution of renal cortical blood flow and on renin release. *Surgery* **80** (1) : 31-39.

GOODYER, A.V.N., GLENN, W.W.L. (1951) Relation of arterial pulse pressure to renal function. *Am. J. Physiol.* **167** (3) : 689-697.

GROSSI, E.A., CONNOLY, M.W., KRIEGER, K.H., NATHAN, I.M., HUNTER, C.E., COLVIN, S.B., BAUMANN, F.G., SPENCER, F.C. (1985) Quantification of pulsatile flow during cardiopulmonary bypass to permit direct comparison of the effectiveness of various types of pulsatile and nonpulsatile flow. *Surgery* **98** (3) : 547-553.

HALDENBY, K.A., CHAPPELL, D.C., WINLOVE, P.C., PARKER, K.H., FIRTH, J.A. (1994) Focal and regional variation in the composition of the glycocalyx of large vessel Endothelium. *J. Vasc. Res.* **31** : 2-9.

HAYEN, W., GOEBLER, M., KUMAR, S., RIESSEN, R., NEHLS, V. (1999) Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *Journal of Cell Science* **112** : 2241-2251.

HENRY, C.B., DULING, B.R. (1999) Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am. J. Physiol.* **277** : H508-514.

HENRY, C.B., DULING, B.R. (2000) TNF- α increase entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am. J. Physiol.* **279** (6) : H2815-23.

HETZER, R., MUELLER, J., WENG, Y., WALLUKAT, G., SPIEGELSBERGER, S., LOEBE, M. (1999) Cardiac recovery in dilated cardiomyopathy by unloading with a left ventricular assist device. *Ann. Thorac. Surg.* **68** : 742-749.

HEYROVSKY, A (1956) A new method for the determination of inulin in plasma and urine. *Clinica Chimica Acta.* **1** : 470-474.

HINDMAN, B. (1994) Cerebral physiology during cardiopulmonary bypass : pulsatile versus nonpulsatile flow. *Advances in pharmacology* **31** : 607-616.

HINDMAN, B.J., DEXTER, F., SMITH, T., CUTKOMP, J. (1995) Pulsatile versus nonpulsatile flow. No difference in cerebral blood flow or metabolism during normothermic cardiopulmonary bypass in rabbits. *Anesthesiology* **82** (1) : 241-250.

- HJALMARSSON, C., JOHANSSON, B.R., HARALDSSON, B (2004) Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries. *Microvascular Research* **67** : 9-17.
- HODGSON, L., TARBELL, J.M. (2002) Solute transport to the endothelial intercellular cleft : the effect of wall shear stress. *Annals of Biomedical Engineering* **30** : 936-945.
- HOLLIS, T.M., ENEA, N.A., KERN, J.A. (1984) Time-dependent changes in aortic albumin permeability characteristics in experimental diabetes. *Experimental and Molecular Pathology* **41 (2)** : 207-217.
- HORNICK, P., TAYLOR, K. (1997) Pulsatile and nonpulsatile perfusion : The continuing controversy. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* **11 (3)** : 310-315.
- HOVER, C.G., KULKARNI, A.P. (2000) A simple and efficient method for hemoglobin removal from mammalian tissue cytosol by zinc sulfate and its application to the study of lipoxygenase. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. **62 (2)** : 97-105.

HU, X., ADAMSON, R.H., LIU, B., CURRY, F.E., WEINBAUM, S. (2000) Starling forces that oppose filtration after tissue oncotic pressure is increased. *Am. J. Physiol.* **279** (4) : H1724-H1736.

HU, X., WEINBAUM, S. (1999) A new view of Starling's hypothesis at the microvascular level. *Microvascular Research* **58** (3) : 281-304.

HUANG, Y., RUMSCHITZKI, D., CHIEN, S., WEINBAUM, S. (1994) A fiber matrix model for the growth of molecular leakage spots in the arterial intima. *Transactions of the ASME* **116** : 430-445.

HUANG, Y., RUMSCHITZKI, D., CHIEN, S., WEINBAUM, S. (1994) A fiber matrix model for the filtration through fenestral pores in a compressible arterial intima. *Am. J. Physiol.* **272** : H2023-H2039.

HUANG, Z.J., TARBELL, J.M. (1997) Numerical simulation of mass transfer in porous media of blood vessel walls. *Am. J. Physiol.* **273** : H464-477.

HUXLEY, V.H., WILLIAMS, D.A. (2000) Role of a glycocalyx on coronary arteriolar permeability to proteins : evidence from enzyme treatments. *Am. J. Physiol.* **278** (4) : H1177-85.

IHRCKE, N.S., WRENSHALL, L.E., LINDMAN, B.J., PLATT, J.L. (1993) Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol. Today* **14** : 500-505.

JIANG, C.F., AVOLIO, A.P. (1997) Characterization of structural changes in the arterial elastic matrix by a new fractal feature : directional fractal curve. *Medical and Biological Engineering and Computing* **35 (3)** : 246-252.

JOBIN, J., NAWAR, T., CARON, C., PLANTE, G.E. (1977) Effect of acetazolamide on renal bicarbonate reabsorption in volume-expanded dogs. *Am. J. Physiol.* **232 (6)** : F484-F489.

JONHSTON, G.G., HAMMILL, F., MARZEC, U., GERARD, D., JOHANSEN, K., DILLEY, R.B., BERNSTEIN, E.F. (1976) Prolonged pulseless perfusion in unanesthetized calves. *Archives of Surgery* **111 (11)** : 1225-1230.

JURRUS, E.R., WEISS, H.S. (1977) In vitro oxygen tensions in the rabbit aortic arch. *Atherosclerosis* **28** : 223-232.

KAJI, T., YAMADA, A., MIYAJIMA, S., YAMAMOTO, C., FUJIWARA, Y., WIGHT, T.N., KINSELLA, M.G. (2000) Cell density-dependant regulation of

- proteoglycans synthesis by transforming growth factor-beta in cultured bovine aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **275 (2)** : 1463-1470.
- KALUNIAN, K.C., CONCOFF, A.L., WOLLASTON, S.J. (2003) Investigational approaches to the pharmacologic therapy of osteoarthritis. Dans Up to Date 11.3 www.Uptodate.com
- KAMM, R.D. (2002) Cellular fluid mechanics. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **34** : 211-32.
- KARMAKAR, N. (2001) Interaction of transmural pressure and shear stress in the transport of albumin across the rabbit aortic wall. *Atherosclerosis* **156** : 321-327.
- KARNER, G., PERKTOLD, K. (2000) Effect of endothelial injury and increased blood pressure on albumin concentration accumulation in the arterial wall : A numerical study. *Journal of Biomechanics* **33** : 709-715.
- KARNER, G., PERKTOLD, K., ZEHENTNER, H.P. (2001) Computational modeling of macromolecule transport in the arterial wall. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* **4** : 491-504.
- KAWAHITO, S., TAKANO, T., NAKATA, K., MAEDA, T., NONAKA, K., LINNEWEBER, J., SCHULTE-EISTRUP, S., SATO, T., MIKAMI, M., GLUECK,

- J., NOSE, Y. (2000) Analysis of the arterial blood pressure waveform during left ventricular nonpulsatile assistance in animal models. *Artificial Organs.* **24 (10)** : 816-820.
- KENAKIN, T. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction, Third Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1997) p. 118-130.
- KEY, N.S., PLATT, J.L., VERCELLOTTI, G.M. (1992) Vascular endothelial cell proteoglycans are susceptible to cleavage by neutrophiles. *Arterioscler. Thromb.* **12** : 836-842.
- KIFOR, G., TOON, M.R., JANOSHAZI, A., SOLOMON, A.K. (1993) Interaction between red cell membrane band 3 and cytosolic anhydrase. *The Journal of Membrane Biology.* **134** : 169-179.
- KIHARA, S., LITWAK, K.N., NICHOLS, L., LITWAK, P., KAMENEVA, M.V., WU, Z., KORMOS, R.L., GRIFFITH, B.P. (2003) Smooth muscle cell hypertrophy of renal cortex arteries with chronic continuous flow left ventricular assist. *Ann. Thorac. Surg.* **75** : 178-183.

KIM, W.H., HONG, M.K., VIRMANI, R., KORNOWSKI, R., JONES, R., LEON, M.B. (2000) Histopathologic analysis of in-stent neointimal regression in a porcine coronary model. *Coronary Artery Disease*. **11(3)** : 273-277.

KIM, W.-S., TARBELL, J.M. (1996) Prediction of macromolecular transport through the deformable porous media of an artery wall by pore theory. *Korean J. of Chem. Eng.* **13 (5)** : 457-465.

KING, M.W. (2003) Glycosaminoglycans. Dans *Medical Biochemistry* Page. www.indstate.edu/thcme/mwking/glycans.html

KO, Y.S., COPPEN, S.R., DUPONT, E., ROTHERY, S., SEVERS, N.J. (2001) Regional differentiation of desmin, connexin43, and connexin45 expression patterns in rat aortic smooth muscle. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** : 355-364.

KONISHI, H., YLAND, M.J., BROWN, M., YAMAZAKI, K., MACHA, M., KONISHI, R., KERRIGAN, J.P., ZHANG, S., RANDHAWA, P.S., ANTAKI, J.F., FUSE, K., KORMOS, R.L. (1996) *ASAIO Journal* **42 (5)** : M720-723.

KOOL, M.J.F., HOEKS, A.P.G., STRUIJKER-BOUDIER, H.A.J., RENEMAN, R.S.,
VAN BORTEL, L. (1993) Short and long-term effects of smoking on arterial wall
properties in habitual smokers. *JACC.* **22** : 1881-1886.

KOSTER, A., LOEBE, M., HANSEN, R., POTAPOV, E.V., NOON, G.P., KUPPE, H.,
HETZER, R. (2000) Alterations in coagulation after implantation of a pulsatile
Novacor LVAD and the axial flow MicroMed DeBakey LVAD. *Ann. Thorac. Surg.*
70 : 533-537.

KREYSZIG, E. Advanced engineering mathematics, seventh edition. John Wiley and
Sons, Inc., NY, É.-U. (1993).

LAURORA, G., CESARONE, M.R. BELCARO, G., DE SANCTIS, M.T., POMANTE,
P., INCANDELA, L., ROMANDINI, S., DUGALL, M. (1998) Control of the
progress of arteriosclerosis in high risk subjects treated with Mesoglycan. Measuring
the intima media. (résumé traduit de l'italien) *Minerva Cardioangiologica* **46 (3)** :
41-47.

LEE, G.L. (Éditeur) Manuel of histologic staining methods of the Armed Forces
Institute of Pathology. McGraw-Hill, É.-U. (1960) p. 34-36.

- LEHMANN, E.D. (1999) Terminology for the definition of arterial elastic properties. *Path. Biol.* **47 (6)** : 656-664.
- LEVESQUE, H., GIRARD, N., MAINGONNAT, C., DELPECH, A., CHAUZY, C., TAYOT, J., COURTOIS, H., DELPHEH, B. (1994) Localisation and solubilisation of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hualuronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis* **105 (1)** : 51-62.
- LEVICK, J.R., SMAJE, L.H. (1987) An analysis of the permeability of a frenestra. *Microvasc. Res.* **33** : 233-256.
- LEVINE, F.H., PHILBIN, D.M., COGGINS, C.H., EMERSON, C.W., AUSTEN, W.G., BUCKLEY, M.J. (1978) Plasma vasopressin levels and urinary Na⁺ excretion during cardiopulmonary bypass. A comparison of pulsatil and nonpulsatil flow. *Surgical forum* **29** : 320-322.
- LEVY, B.I. (1999) Mechanics of the large artery vascular wall. *Pathologie Biologie* **47(6)** : 634-640.
- LIN, S.J., JAN, K.M., SCHUESSLER, G., WEINBAUM, S., CHIEN, S. (1988) Enhanced macromolecular permeability of aortic endothelial cells in association with mitosis. *Atherosclerosis* **73** : 223-232.

LIN, S.J., JAN, K.M., WEINBAUM, S., CHIEN, S. (1989) Transendothelial transport of low-density lipoprotein in association with cell mitosis in rat aorta. *Arteriosclerosis* **1989 (9)** : 230-236.

LONDON, G.M., COHN, J.N. (2002) Prognostic application of arterial stiffness : Task forces. *American Journal of Hypertension* **15** : 754-758.

LONDONO, I. et BENDAYAN, M. (1989) Distribution of endogenous albumin across the rat aortic wall as revealed by quantitative immunocytochemistry. *The American Journal of Anatomy* **188** : 407-416.

LONDONO, I. et BENDAYAN, M. (1990) Quantitative immunocytochemical studies of endogenous albumin in rat aortic endothelial and mesothelial cells. *Biol. Cell* **69** : 161-169

LONDONO, I. et BENDAYAN, M. (1992) Endothelial cell protrusions in the rat aortic wall : Immunocytochemical evidence for an alternative transendothelial passage of plasma proteins. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular pathology*. **61** : 419-422.

LONDONO, I. et BENDAYAN, M. (2001) Temporary effects of circulating Amadori products on glomerular filtration properties in the normal mouse. *Am. J. Physiol.* **280** : F103-F111.

LONDONO, I., LECLERC, Y., BENDAYAN, M. (1992) Ultrastructural localisation of endogenous albumin in human aortic tissue by protein A-Gold immunocytochemistry. *Am. J. Pathol.* **140** (1) : 179-191.

LONDONO, I., GHITESCU, L., BENDAYAN, M. (1995) Glomerular handling of circulating glycated albumin in the normal mouse kidney. *Am. J. Physiol.* **268** : F913-F921.

LORTIE, M., REGOLI, D., RHALEB, N.-E., PLANTE, G.E. (1992) The role of B1- and B2-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am. J. Physiol.* **262** : R72-R76.

LOUTZENHISER, R., BIDANI, A., CHILTON, L. (2002) Renal myogenic response. *Circulation Research* **90** : 1316.

LOWE-KRENTZ, L.J., THOMPSON, K., PATTON II W.A. (1992) Heparin releasable and nonreleasable forms of heparan sulfate proteoglycan are found on the surfaces

of cultured porcine aortic endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **109** : 51-60.

LUFT, J.H. (1966) Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Microcirc. Symp. Fed. Proc.* **25** : 1173-1783.

MA, P., LI, X., KU, D.N. (1994) Heat and mass transfert in a separated flow region for high Prandlt and Schimdt numbers under pulsatile conditions. *Journal of Heat and Mass Tranfert* **37 (17)** : 2723-2736.

MADDOUX, G., PAPPAS, G., JENKINS, M., BATTOCK, D., TROW, R., SMITH, S.C., STEELE, P. (1976) Effect of pulsatile and nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass on left ventricular ejection fraction early after aortocoronary bypass surgery. *Am. J. Cardiol.* **37 (7)** : 1000-6.

MALHEIROS, S.V.P., PAULA, E., MEIRELLES, N.C. (1998) Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1373** : 332-340.

MANCEAU, J. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de maitrise : Étude numérique d'un modèle de transport de macromolécules à travers la paroi artérielle. Département de Génie Mécanique. École Polytechnique de Montréal. Avril 2002.

MANGONI, AA. et al. (1996) Heart-rate dependence of arterial distensibility in vivo.

Journal of hypertension. **14** : 897-901.

MANY, M., GIRON, F., BIRTWELL, W.C., DETERLING, R.A., SOROFF, H.S.

(1969) Effects of depulsation of renal blood flow upon renal function and renin secretion. Surgery **66** (1) : 242-249.

MAREN, T.H. (1967) Carbonic anhydrase : Chemistry, physiology, and inhibition.

Physiol. Rev. **47** : 595-781.

MARQUE V. et al. (sept. 1999), Elastic properties and composition of the aortic wall in

old spontaneously hypertensive rats. Hypertension **34** (3) : 415-22.

MASSON, J.C., CURRY, F.E., MICHEL, C.C. (1977) The effects of proteins upon the

filtration coefficient of individually perfused frog mesenteric capillaries.

Microvascular research **13** : 185-202.

McNAMEE, J.C. (1982) Restricted dextran transport in the sheep lung lymph

preparation. J. Appl. Physiol. **52**(3) : 585-590.

- MELROSE, J., SMITH, S., GHOSH, P., WHITELOCK, J. (2003) Perlecan, the multidomain heparan sulfate proteoglycan of basement membranes, is also a prominent component of the cartilaginous primordia in the developing human fetal spine. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **51(10)** : 1331-1341.
- MERTENS, G., CASSIMAN, J.-J., VAN DEN BERGHE, H., VERMYLEN, J., DAVID, G. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *J. Biol. Chem.* **267** : 20435-20443.
- MEYER, G., MERVAL, R., TEDGUI, A. (1996) Effects of pressure-induced stretch and convection on low-density lipoprotein and albumin uptake in the rabbit aortic wall. *Circ. Res.* **79** : 532-540.
- MIGLIAVACCA, F., PETRINI, L., COLOMBO, M., AURICCHIO, F., PIETRABISSA, R. (2002) Mechanical behavior of coronary stents investigated through the finite element method. *Journal of biomechanics* **35** : 803-811.
- MIWA, I., SUZUKI, S. (2002) An Improved quantitative assay of glycogen in erythrocytes. *Ann. Clin. Biochem.* **39** : 612-613.

- MOCHIZUKI, S., VINK, H., HIRAMATSU, O., KAJITA, T., SHIGETO, F., SPAAN, J.A., KAJIYA, K. (2003) Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am. J. Physiol.* **285** (2) : H722-H726.
- MORI, A., WATANABE, K., ONOE, M., WATARIDA, S., NAKAMURA, Y., MAGARA, T., TABATA, R., OKADA, Y. (1988) Regional blood flow in the liver, pancreas and kidney during pulsatile and nonpulsatile perfusion under profound hypothermia. *Japanese Circulation Journal* **52** (3) : 219-227.
- MOULTON, K.S., HELLER, E., KONERDING, M.A., FLYNN, E., PALINSKI, W., FOLKMAN, J. (1999) Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **99** : 1726-1732.
- MOORE, J.E., BERRY, J.L. (2002) Fluid and solid mechanical implications of vascular stenting. *Annals of Biomedical Engineering* **30** : 498-508.
- MURAI, N., ICHIKAWA, S., WATANABE, K., SHINOHARA, T., GLUECK, J., MOTOMURA, T., ISHITOYA, H., ASHIZAWA, S., MATSUI, T., SUMIKURA, H., ICHIHASHI, F., NOSE, Y. (2003) Physiological adaptation to a nonpulsatile biventricular assist system. *ASAIO Journal* **49** (3) : 345-348.

NADEAU, G. Introduction to elasticity. Holt, Rinehart and Winston, Inc., NY, É.-U.
(1964) p. 210-221.

NADER, H.B., STRAUS, A.H. (1983) Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111** : 865-871.

NAKATA, K., OHASHI, Y., TAYAMA, E., OHTSUKA, G., TAKAMI, Y., MUELLER, J., GLUECK, J., NOSE, Y. (1998) Estimation of the native cardiac output from a rotary blood pump flow : In vitro study. *Artificial Organs* **22** (5) : 411-413.

NARULA, J. (2004) Apoptosis in heart failure. Dans Up to Date 12.1
www.Uptodate.com

NICHOLS, W.W., O'ROURKE, M.F. McDonald's blood flow in arteries, theoretic, experimental and clinical principles. Third edition. Édition LEA et FEBIGER, Philadelphie, É.-U. (1990).

- NIEVELSTEIN, P.F.E.M., FOGELMAN, A.M., MOTTINO, G., FRANK, J.S. (1991)
Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **11** : 1795-1805.
- NOSE, Y., KAWAHITO, K. (1997) Developpement of a non-pulsatile permanent rotary blood pump. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **11 suppl** : s32-s38.
- NOSE, Y., YOSHIKAWA, M., MURABAYASHI, S., TOKANO, T. (2000)
Development of rotary blood pump technology : Past, present, and future. *Artificial organs* **24 (6)** : 412-420.
- OBUNIKE, J.C., LUTZ, E.P., PAKA, L., KATOPODIS, T., STRICKLAND, D.K., KOZARSKY, K.F., PILLARISSETTI, S., GOLDBERG, I.J. (2001) Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276 (12)** : 8934-8941.
- O'BRIEN, K.D., OLIN, K.L. et al. (1998) Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques : Colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation* **98** : 519.

- OGAWA, K., IMAI, M., OGAWA, T., TSUKAMOTO, Y., SASAKI, F. (2001) Caveolar and intercellular channels provide major transport pathways of macromolecules across vascular endothelial cells. *The anatomical record* **264** : 32-42.
- OHHIRA, A., OHHASHI, T. (1992) Effects of aortic pressure and vasoactive agents on the vascular resistance of the vasa vasorum in canine isolated thoracic aorta. *J. Physiol.* **453** : 233-245.
- O'ROURKE, M.F. (1994) Arterial hemodynamics and ventricular-vascular interaction in hypertension. *Blood Pressure* **3** : 33-37.
- O'ROURKE, M.F. (1999) Mechanical principles, arterial stiffness and wave reflexion. *Pathologie Biologie* **47 (6)** : 623-633.
- O'ROURKE, M.F., STAESSEN, J.A., VLACHOPOULOS, C., DUPREZ, D., PLANTE, G.E. (2002) Clinical applications of arterial stiffness ; Definition and reference values. *Am. J. Hyper.* **15 (5)** : 426-444.
- PANNIER, B.M., AVOLIO, A.P., HOEKS, A., MANCIA, G., TAKAZAWA, K. (2002) Methods and devices for measuring arterial compliance in humans. *Am. J. Hyper.* **15** : 743-753.

PAQUET, K.J. (1969) Hemodynamic studies on normothermic perfusion of the isolated pig kidney with pulsatile and non pulsatile flows. *Journal of cardiovascular surgery* **10 (1)** : 45-53.

PENTIKAINEN, M.O., LEHTONEN, E.M., OORNI, K., LUSA, S., SOMERHARJU, P., JAUHAINEN, M., KOVANEN, P.T. (1997) Human arterial proteoglycans increase the rate of proteolytic fusion of low density lipoprotein particules. *Journal of Biological Chemistry*. **272 (40)** : 25283-8.

PIETRA, G.G., LEWIS W.J. (1996) Confocal- and electron-microscopic localization of FITC-albumin in H₂O₂-induced pulmonary edema. *J. Appl. Physiol.* **80(1)** : 182-190.

PHILBIN, D.M., LEVINE, F.H., KONO, K., COGGINS, C.H., MOSS, J., SLATER, E.E., BUCKLEY, M.J. (1981) Attenuation of the stress response to cardiopulmonary bypass by the addition of pulsatile flow. *Circulation* **64 (4)** : 808-812.

PHILLIPS, W.M. Modeling of flows in the circulatory system. Dans Karger, Basel, *Adv. Cardiovasc. Phys.* Vol 5 (part I) (1983) p. 26-48.

PINHAL, M.A.S., TRINDAL, E.S., FAREED, J., DIETRICH, C.P., NADER, H.B.

(2001) Heparin and a cyclic octaphenol-octasulfonic acid (GL-522-Y-1) bind with high affinity to a 47-kDa protein from vascular endothelial cell surface and stimulate the synthesis and structural changes of heparan sulfate proteoglycan. *Thrombosis Research* **103 (1)** : 35-45.

PLANT, S., LEACH, L. (2002) Comparison of the effect of pulsatile and nonpulsatile

shear stress on adherens junctions in human endothelial cells. *Proceedings of the Anatomical Society of Great Britain and Ireland*. **2002** : 532-533.

PLANTE, G.E. (2002) Vascular response to stress in health and disease. *Metabolism* **51**

(6) suppl 1 : 25-30.

PODGOREANU, M.V., STOUT, R.G., EL-MOALEM, H.E., SILVERMAN, D.G.

(2002) Synchronous rythmical vasomotion in the human cutaneous microvasculature during nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* **97 (5)** : 1110-1117.

POTAPOV, E.V., LOEBE, M., ABDUL-KHALIQ, H., KOSTER, A., STEIN, J.,

SODIAN, R., KOPITZ, M., HAUSMANN, H., NOON, G.P., DeBAKEY, M.E., HETZER, R. (2001) Postoperative course of S-100B protein and neuron-specific

- enolase in patients after implantation of continuous and pulsatile flow LVADs. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **20** (12) : 1310-1316.
- PREISMAN, S., PFEIFFER, U., LIEBERMAN, N., PEREL, A. (1997) New monitors of intravascular volume : A comparison of arterial pressure waveform analysis and the intrathoracic blood volume. *Intensive Care Med.* **23** : 651-657.
- PRIBOR, D.B. (1970) Osmotic hemolysis contrasted with freeze-thaw hemolysis. *Cryobiology* **8** : 14-24.
- PRIES A.R., SECOMB, T.W., GAEHTGENS, P. (2000) The endothelial surface layer. *Eur. J. Physiol.* **440** : 653-666.
- QUARTERONI, A., TUVERI, M., VENEZIANI, A. (2000) Computational vascular fluid dynamics : problems, models and methods. *Computing and visualization in science* **2** : 163-197.
- RAPATZ, G., LUYET, B. (1970) Hemolysis in several animal species after rapid freezing of blood. *J. Cell. Physiol.* **77** : 373-376.
- RACKLEY, C.E. (2003) Pathogenesis of atherosclerosis. Dans *Up to Date* 12.1 www.Uptodate.com

- RANDALL, R.F., MAREN, T.H. (1972) Absence of carbonic anhydrase in red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **268** : 730-732.
- RENKIN, E.M., (1985) Capillary transport of macromolecules : pores and other endothelial pathways. *J. Appl. Physiol.* **58** : 315-325.
- REUTER, D.A., FELBINGER, T.W., KILGER, E., SCHMIDT, C., LAMM, P., GOETZ, A.E. (2002) Optimizing fluid therapy in mechanically ventilated patients after cardiac surgery by on-line monitoring on left ventricular stroke volume variations. Comparison with aortic systolic pressure variations. *British Journal of Anesthesia* **88** (1) : 124-126.
- RHODIN, J.A.G. Architecture of the vessel wall. Dans D.F. Bohr, A.D. Somlyo, H.V. Sparks (Eds) : *Handbook of Physiology, the cardiovascular system*, vol. 2, American Physiological Society, Bethesda, Maryland (1980) p. 1-31.
- RICHARDSON, M., HATTON, M.W.C., MOORE, S. (1998) Proteoglycans distribution in the intima and media of the aortas of young and aging rabbits : an ultrastructural study. *Atherosclerosis* **71** : 243-256.

ROMAN, M.J. et al. (1992) Parallel cardiac and vascular adaptation in hypertension, *Circulation*, **86** : 1909-1918.

ROSE, E.A., GELIJNS, A.C., MOSKOWITZ, A.J., HEITJAN, D.F., STEVENSON, L.W., DEMBITSKY, W., LONG, J.W., ASCHEIM, D.D., TIERNEY, A.R., LEVITAN, R.G., WATSON, J.T., RONAN, N.S., MEIER, P. (2001) Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure (REMATCH Study). *New England Journal of Medicine* **345 (20)** : 1435-1443.

ROSTGAARD, J., QVORTRUP, K. (1997) Electron microscopic demonstration of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvascular Research* **53** : 1-13.

ROYER, D., DIEULESAINT, E. *Ondes élastiques dans les solides, Tome 1 Propagation libre et guidée*. Masson, Paris, France (1996).

SAFAR, M.E. (2001) Systolic blood pressure, pulse pressure and arterial stiffness as cardiovascular risk factors. *Current opinion in nephrology and hypertension* **10** : 257-261.

SAFAR, M.E., LONDON, G.M., ASMAR, R., FROHLICH, E.D. (1998) Overview : Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension* **32(1)** : 156-161.

SAFAR, M.E., LONDON, G.M., PLANTE, G.E. (2004) Arterial stiffness and kidney function. *Hypertension* **43** (2) : 163-168.

SAITO, S., WESTABY, S., PIGGOT, D., DUDNIKOV, S., ROBSON, D., CATARINO, P.A., CLELLAND, C., NOJIRI, C. (2002) End-organ function during chronic nonpulsatile circulation. *Annals of Thoracic Surgery* **74** (4) : 1080-1085.

SALENCON, J. Mécanique des milieux continus. École Polytechnique partenaire de l'AUPELF/UREF. Ellipses, Paris, France (1995) 342-343.

SANS, M., MORAGAS, A. (1993) Mathematical morphologic analysis of the aortic medial structure. Biomechanical implications. *Analytical and quantitative cytology and histology* **15** (2) : 93-100.

SCHIMA, H., LACKNER, B., PROSI, M., PERKTOLD, K. (2003) Numerical simulation of carotid hemodynamics in patients with rotary blood pump cardiac assist. *International Journal of Artificial Organs* **26** (2) : 152-160.

SCHNEEBERGER, E.E., LYNCH, R.D. (2004) The tight junction : a multifunctional complex. *Am. J. Physiol.* **286** : C1213-C1228.

- SCHWENKE, D.C. (2000) Metabolic evidence for sequestration of low-density lipoprotein in abdominal aorta of normal rabbits. *Am. J. Physiol.* **279** : H1128-H1140.
- SCOTT, J.E., HUGHES, E.W. (1983) Differential staining of polyanions according to critical electrolytes concentration principles in mixed solvents. *J. Microsc.* **129** : 209-219.
- SCOTT, L., KERR, A., HAYDOCK, D., MERRILEES, M. (1997) Subendothelial proteoglycan synthesis and transforming growth factor beta distribution correlate with susceptibility to atherosclerosis. *Journal of Vascular Research* **34 (5)** : 365-377.
- SEGERS, P., VERDONCK, P. Non invasive estimation of total arterial compliance dans *Fluid dynamics and biological flows*, Von Karman Institute for Fluid Dynamics, Belgium (1998).
- SEZAI, A., SHIONO, M., ORIME, Y., NAKATA, K., HATA, M., IIDA, M., KASHIWAZAKI, S., KINOSHITA, J., NEMOTO, M., KOUJIMA, T., FURUICHI, M., EDA, K., HIROSE, H., YOSHINO, T., SAITOH, A., TANIGUCHI, Y., SEZAI, Y. (1999) Major organ function under mechanical support : comparative studies of pulsatile and nonpulsatile circulation. *Artificial Organs* **23 (3)** : 280-285.

SEZAI, A., SHIONO, M., ORIME, Y., NAKATA, K., HATA, M., IIDA, M., KASHIWAZAKI, S., KINOSHITA, J., NEMOTO, M., KOUJIMA, T., SEZAI, Y., SAITOH, A. (1997) Renal circulation and cellular metabolism during left ventricular assisted circulation : Comparison study of pulsatile and nonpulsatile assists. *Artificial Organs* **21 (7)** : 830-835.

SEZAI, A., SHIONO, M., ORIME, Y., NAKATA, K., HATA, M., IIDA, M., NEMOTO, M., KOHJIMA, T., SEZAI, Y., TANIGUCHI, Y. (1998) Microcirculation of kidney and shin during left ventricular assisted circulation : Comparative studies of pulsatile and nonpulsatile assists. (résumé traduit du japonais) *Japanese Journal of Thoracic and cardiovascular Surgery*. **46 (12)** : 1239-1246.

SEZAI, A., SHIONO, M., ORIME, Y., NAKATA, K., MITSUMASA, H., NEMOTO, M., SAITOH, T., SEZAI, Y. (1996) Comparison studies of major organ microcirculations under pulsatile and nonpulsatile-assisted circulations. *Artificial Organs* **20 (2)** : 139-142.

SHARAWY, M., ALI, A.M., CHOI, W.-S. (2003) Experimental induction of anterior disk displacement of the rabbit craniomandibular joint : an immuno-electron microscopic study of collagen and proteoglycan occurrence in the condylar cartilage. *J. Oral Pathol. Med.* **32** : 176-184.

SILVESTO, L., RUIKON, C., SOMMER, F., DUC, T.M., BIANCONE, L.,
MONTRUCCHIO G., CAMUSSI, G., (1994) Platelet activating factor induced
endothelial cell expression of adhesion molecules and modulation of surface
glycocalyx, evaluated by electron spectroscopy chemical analysis. *Semin. Thromb
Hemost* **20** : 214-222.

SILVER, F.H. *Biological material : Structure, mechanical properties, and modeling of
soft tissues*. New York University Press. New York and London (1987) p. 27-222.

SIMIONESCU, M., GAFENCU, A., ANTOHE, F. (2002) Transcytosis of plasma
macromolecules in endothelial cells : A cell biological survey. *Microsc. Res. Tech.*
57 : 269-288.

SIMS, D.E., HORNE, M.M. (1994) Non-aqueous fixative preserves macromolecules on
the endothelial cell surface : An in situ study. *European Journal of Morphology* **32**
(1) 59-64.

SIMS, D.E., HORNE, M.M. (1997) Heterogeneity of the composition and thickness of
tracheal mucus in rats. *Am. J. Physiol.* **273** : L1036-L1041.

SKALAK, R., CHIEN, S. Handbook of bioengineering. McGraw-Hill Book Compagny, NY, É.-U. (1987) p. 16.1-16.28.

SONG, S.H., ROACH, M.R. (1983) Quantitative changes in the size of fenestrations of the elastic laminae of sheep thoracic aorta studied with SEM. *Blood vessels* **20** : 145-153.

SQUIRE, J.M., CHEW, M., NNEJI, G., NEAL, C., BARRY, J., MICHEL, C. (2001) Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx : A possible explanation for molecular filtering ? *Journal of Structural Biology* **136 (3)** : 239-255.

STACE, T.M., DAMIANO, E.R. (2001) An Electrochemical model of the transport of charged molecules through capillary glycocalyx. *Biophysical Journal* **80** : 1670-1690.

STARMANS-KOOL, M.J.F., VAN BORTEL, L.M.A.B. (1999) High resolution angiometers for the assessment of the elastic modulus. *Path Biol.* **47 (7)** : 705-715.

STEELE, B.N., WAN, J., KU, J.P., HUGHES, T., TAYLOR, C. (2003) In vivo validation of a one-dimensional finite-element method for predicting blood flow in

- cardiovascular bypass grafts. IEEE Transaction on Biomedical Engineering **50 (6)** : 649-655.
- STEFANADIS, C., VLACHOPOULOS, C., KARAYANNACOS, P. et al., (1995)
Effects of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. Circulation **91 (10)** : 2669-2678.
- STERGIOPULOS, N., VULLIMÉMOZ S., RACHEV, A., MEISTER, J.-J. (2001)
Assessing the homogeneity of the elastic properties and composition of the pig aortic media. Journal of vascular research **38** : 237-256.
- TADA, S., TARBELL, J.M. (2000) Interstitial flow through the internal elastic lamina affects shear stress on arterial smooth muscle cells. Am. J. Physiol. **278** : H1589-H1597.
- TADA, S., TARBELL, J.M. (2001) Fenestral pore size in the internal elastic lamina affects transmural flow distribution in the artery wall. Annals of Biomedical Engineering **29** (456-466).
- TADA, S., TARBELL, J.M. (2004) Internal elastic lamina affects the distribution of macromolecules in the arterial wall : a computational study. Am. J. Physiol. **287** : H905-H913.

TAENAKA, Y., TATSUMI, E., NAKAMURA, H., NAKATANI, T., YAGURA, A., SEKII, H., SASAKI, E., AKAGI, H., GOTO, M., TAKANO, H. (1990) ASAIO Transactions **36 (3)** : M541-544.

TAGUCHI, S., YOZU, R., ISEKI, H., SOMA, Y., INOUE, T. (1988) Effects of nonpulsatile and pulsatile right ventricular bypass on pulmonary circulation. ASAIO Transactions **34 (3)** : 213-221.

TAKANA, K., YADA, I. (2003) NTS neuronal response to conversion from pulsatile to nonpulsatile pressure in isolated carotid sinus baroreceptors. Artificial Organs **27 (9)** : 833-839.

TARBELL, L.M., LEVER, M.J., CARO, C.G. (1988) The effect of varying albumin concentration on the hydraulic conductivity of the rabbit common carotid artery. Microvascular Research **35** : 204-220.

TAYLOR, K.M., WRIGHT, G.S., BAIN, W.H., CAVES, P.K., BEASTALL, G.S. (1978) Comparative studies of pulsatile and nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass III. Response of anterior pituitary gland to thyrotropin-releasing hormone. Thoracic and Cardiovascular Surgery **75 (4)** : 579-584.

TAYLOR, K.M., WRIGHT, G.S., REID, J.M., BAIN, W.H., CAVES, P.K., WALKER, M.S., GRANT, J.K. (1978) Comparative studies of pulsatile and nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass II. The effects on adrenal secretion of cortisol. *Thoracic and Cardiovascular Surgery* **75 (4)** : 574-578.

TEDGUI, A. et LEVER, J., (1984) Filtration through damaged and undamaged rabbit thoracic aorta. *Am. J. Physiol.* **247** : H784-H791.

TEDGUI, A. et LEVER, J., (1985) The Interaction of convection and diffusion in the transport of ^{131}I -albumin within the media of the rabbit thoracic aorta. *Circ. Res.* **57** : 856-863.

TEDGUI, A. et LEVER, J., (1987) Effect of pressure and intimal damage on ^{131}I -albumin and [^{14}C]sucrose spaces in aorta. *Am. J. Physiol.* **253** : H1530-H1539.

TEDGUI, A., MERVAL, R., ESPOSITO, B. (1992) Albumin transport characteristics of rat aorta in early phase of hypertension. *Circulation Research* **71** : 932-942.

THOMPSON, D.D., PITTS, R.F. (1952) Effects of alterations of renal arterial pressure on sodium and water excretion. *Am. J. Physiol.* **168 (2)** : 490-499.

- THORIN, E., SHREEVE, S.M. (1998) Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol. Ther.* **78 (3)** : 155-166.
- TIIHONEN, K., NIKINMAA, M. (1991) D-glucose permeability in river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) and carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Comparative physiology* **100 (3)** : 581-584.
- TOLEDO-PEREYRA, L., MOBERG, A.W., NAJARIAN, J.S. (1973) Reassessment of nonpulsatile flow for renal hypothermic perfusion. *Transplantation* **16 (4)** : 385-388.
- TRACY, C.M. (2003) Tachycardia-mediated cardiomyopathy. Dans Up to Date 12.1 www.Uptodate.com
- TRANMER, B.I., GROSS, C.E., KINDT, G.W., ADEY, G.R. (1986) Pulsatile versus nonpulsatile blood flow in the treatment of acute cerebral ischemia. *Neurosurgery* **19 (5)** : 724-731.
- TROPEA, B.I., SCHWARZACHER, S.P., CHANG, A., ASVAR, C., HUIE, P., SIBLEY, R.K., ZARINS, C.K. (2000) Reduction of aortic wall motion inhibits hypertension-mediated experimental atherosclerosis. *Hypertension* **20 (9)** : 2127-2133.

- TRUSKEY, G.A., ROBERTS, W.L., HERMANN, A., MALINAUSKAS, R.A. (1992) Measurement of endothelial permeability to ¹²⁵I-low density lipoproteins in rabbit arteries by use of en face preparations. *Circulation research* **71** : 883-897.
- TSAY, R., WEINBAUM, S., PFEFFER, R. (1989) A new model for capillary filtration based on recent electron microscopic studies of endothelial junctions. *Chem. Eng. Comm.* **82** : 67-102.
- TSUTSUI, T., NOSE, Y. (1986) Arterial pressure pulsation during nonpulsatile biventricular bypass experiments : possible idioperipheral pulsation. *Artificial Organs* **10 (2)** : 153-155.
- TURNER, M.R., CLOUGH, G., MICHEL, C.C. (1983) The effects of cationised ferritin and native ferritin upon the filtration coefficient of single frog capillaries. Evidence that Proteins in the endothelial cell coat influence permeability. *Microvascular Research* **25** : 205-222.
- UNDAR, A (2002) The ABCs of research on pulsatile versus nonpulsatile perfusion during cardiopulmonary bypass. *Medical Science Monitor* **8 (12)** : ED21-4.

- VALENTINE, W.N., PAGLIA, D.E. (1983) Partial purification of some red cell enzymes utilizing hemoglobin precipitation by zinc salts. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **101** (4) : 617-622.
- VAN BORTEL, L., STRUIJKER-BOUDIER, H.A.J., SAFAR, M.E. (2001) Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension* **38** (4) : 914-921.
- VAN DEN BERG, B.M., VINK, H., SPAAN, J.A.E. (2003) The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ. Res.* **92** : 592-594.
- VAN HAAREN, P.M.A., VANBAVEL, E., VINK, H., SPAAN, J.A.E. (2003) Localisation of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am. J. Physiol.* **285** : H2848-H2856.
- VAN KESTEREN, C.A.M., SARIS, J.J., DEKKERS, D.H.W., LAMERS, J.M.L., SAXENA, P.R., SCHALEKAMP, M.A.D.H., DANSER, A.H.J. (1999) Cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts do not synthesize renin or angiotensinogen: Evidence for stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy independent of angiotensin II. *Cardiovasc. Res.* **43** : 148-156.

VATTA, M., STETSON, S.J., JIMENEZ, S., ENTMAN, M.L., NOON, G.P., BOWLES, N.E., TOWBIN, J.A., TORRE-AMIONE, G. (2004) Molecular normalisation of dystrophin in the failing left and right ventricle of patients treated with either pulsatile or continuous flow-type ventricular assist devices. *Journal of the American College of Cardiology* **43** (5) : 811-817.

VATTA, M., STETSON, S.J., PEREZ-VERDIA, A. et al. (2002) Molecular remodeling of dystrophin in patients with end-stage cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. *Lancet* **359** : 936-941.

VINK, H., CONSTANTINESCU, A.A., SPAAN, J.A.E. (2000) Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implication for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* **101** : 1500-1502.

VINK, H., DULING, B.R. (1996) Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes and leucocytes within mammalian capillaries. *Circ. Res.* **79** : 581-589.

VINK, H., DULING, B.R. (2000) The capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am. J. Physiol.* **278** : H285-H289.

- VUREK, G.G., PEGRAM, S.E. (1966) Fluorometric method for the determination of nanogram quantities of inulin. *Analytical Biochemistry* **16** : 409-419.
- WALKER, N.L., COBBE, S.M., BIRNIE, D.H. (2004) Tachycardiopathy : A diagnosis not to be missed (case report). *Heart* **90** (2) : e7.
- WESTABY, S., KATSUMATA, T., HOUEL, R., EVANS, R., PIGOTT, D., FRAZIER, O.H., JARVIK, R. 1998 Jarvik 2000 Heart : Potential for bridge to myocyte recovery. *Circulation* **98** (15) : 1568-1574.
- WESTERBACKA, J., WILKINSON, I., COCKCROFT, J., UTRIAINEN, T., VEHKAVAARA, S., YKI-JARVINEN, H. (1999) Diminished wave reflexion in the aorta : A novel physiological action of insulin on large blood vessels. *Hypertension* **33** (5) : 1118-1122.
- WHALLEY, A. (1994) Biodur Products ; Polymers, auxiliaries and equipments for plastination ; Catalog and price list.
- WIGG, H., DeCARLO, M., SIBLEY, L., RENKIN, E.M. (1992) Interstitial exclusion of albumin in rat tissues measured by a continuous infusion method. *Am. J. Physiol.* **263** : H1222-H1233.

WILSON, B. (2003) Fick's first law. dans connection rice university
<http://cnx.rice.edu/content/m11365/latest/>

WINLOVE, C.P., PARKER, K.H. (1987) The influence of the elastin lamellae on mass transport in the arterial wall. *Adv. Microcirc.* **13** : 74-81.

WOLINSKY, H., and DALY, M.M. (1970) A method for the isolation of intima-media samples from arteries. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **135** : 364-368.

WOLINSKY, H., GLAGOV, S. (1967) Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ. Res.* **20 (4)** : 409-421.

WOLINSKY, H., GLAGOV, S. (1969) Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circ. Res.* **25 (6)** : 677-687.

WONG, L.C.Y., LANGILLE, B.L. (1996) Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries. *Circulation Research* **78** : 799-805.

XI, H., SHIN, W.S., SUZUKI, J. et al. (2000) Dystrophin disruption might be related to myocardial cell apoptosis caused by Isoproterenol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36** : S25-29.

YAMAKAWA, T., BAI, H.Z., MASUDA, J., SAWA, Y., SHIRAKURA, R., OGATA, J., MATSUDA, H. (2000) Differential expression of proteoglycans biglycan and decorin during neointima formation after stent implantation in normal and atherosclerotic rabbit aortas. *Atherosclerosis* **152** (2) : 287-297.

YANG, W.-J. *Biothermal-fluid sciences : Principles and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, NY, É.-U. (1989) 410 pages.

YOZU, R., GOLDING, L., YADA, I., HARASAKI, H., TAKATANI, S., KAWAKA, S., NOSE, Y. (1994) Do we really need pulse ? Chronic nonpulsatile and pulsatile blood flow : From the exercise response viewpoints. *Artificial Organs*. **18** (9) : 638-642.

ZHANG, H., SLUTSKY, A.S., VINCENT, J.L. (2000) Oxygen free radiacals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med*. **26** : 474-476.

ZIMMERMAN, M., McGEACHIE, J. (1986) Quantification of the relationship between aortic endothelial intercellular cleft morphology and permeability to albumin. *Atherosclerosis* **59** (3) : 277-282.