

LA POLLUTION AU MONOXYDE DE CARBONE FAVORISE LE REMODELAGE CARDIAQUE ET LES ARYTHMIES VENTRICULAIRES CHEZ LE RAT SAIN.

André Lucas (Doctorant)¹, lucas.andre@inserm.fr
Boissière Julien (Post-doctorant)^{1,2}, julien.boissiere@univ-avignon.fr
Reboul Cyril (MCU)², cyril.reboul@univ-avignon.fr
Perrier Romain (Post-doctorant)¹, romain.perrier@inserm.fr
Zalvidea Santiago (Doctorant)¹, santiago.zalvidea@inserm.fr
Meyer Grégory (Doctorant)², gregory.meyer@univ-avignon.fr
Thireau Jérôme (Post-doctorant)¹, jerome.thireau@inserm.fr
Tanguy Stéphane (MCU)², stephane.tanguy@univ-avignon.fr
Bideaux Patrice. (Technicien)¹, patrice.bideaux@inserm.fr
Hayot Maurice (PU-PH)³, m-hayot@chu-montpellier.fr
Boucher François (Professeur)⁴, Francois.Boucher@ujf-grenoble.fr
Obert Philippe (Professeur)², philippe.obert@univ-avignon.fr
Cazorla Olivier (CR1 CNRS).¹, olivier.cazorla@inserm.fr
Richard Sylvain (DR1 CNRS).¹ sylvain.richard@inserm.fr

¹ INSERM, U-637, Physiopathologie Cardiovasculaire, Universités Montpellier1-2, F-34295, Montpellier ; ² EA-4278, Université Avignon/Pays de Vaucluse, UFR Sciences, F-84000 Avignon ; ³ INSERM ERI25, Universités Montpellier1 - 34295 Montpellier ; ⁴ UMR5525, Laboratoire TIMC-PRETA, Université Grenoble, F-38706 La Tronche.

Etat du sujet – enjeux

L'OMS estime que 3 millions de personnes meurent chaque année dans le monde en relation avec la pollution atmosphérique causée par les véhicules et les émissions industrielles (<http://www.who.int>; <http://www.infoforhealth.org>). Les études épidémiologiques permettent d'établir un lien entre pollution atmosphérique et augmentation du risque de mortalité due aux maladies cardio-vasculaires avec des décès impliquant l'ischémie cardiaque, les arythmies ventriculaires et l'insuffisance cardiaque [Réf. 1-4]. Il est rapporté une recrudescence du taux de fréquentation des hôpitaux, notamment des services de cardiologie, lors de pics de pollution. Parmi les agents présents dans l'air atmosphérique, le monoxyde de carbone (CO)

est largement impliqué dans la survenue de ces accidents cardiovasculaires et la mortalité cardiaque associée [réf. 5-9]. Cependant, la physiopathologie des effets du CO est très peu documentée. La compréhension des mécanismes sous-jacents aux altérations induites par une pollution au CO est susceptible de permettre une meilleure compréhension des risques environnementaux. À cet égard, l'utilisation d'un modèle animal présente plusieurs avantages, notamment une meilleure standardisation des approches expérimentales ainsi que des investigations des mécanismes cellulaires.

Notre objectif ici était d'évaluer les effets d'une exposition chronique au CO, de niveau cohérent avec celui de certaines pollutions citadines, sur la fonction cardiaque dans un modèle expérimental sain (rat).

Matériels et méthodes

Des rats *Wistar* âgés de 13 semaines ont été exposés pendant 4 semaines à de l'air sain (CO <1 ppm : groupe contrôle) ou de l'air enrichi en CO (12 heures à 30 ppm avec 5 pics d'une heure à 100 ppm par période de 24 heures : groupe CO) à un niveau reproduisant des conditions de pollution urbaine. La fonction myocardique des animaux a été évaluée par échocardiographie, par une analyse de l'électrocardiogramme de surface (ECG), et par la mesure *in vitro* de différents paramètres du couplage excitation-contraction de cardiomyocytes isolés enzymatiquement à partir du ventricule gauche (VG). Des analyses biochimiques des protéines impliquées dans la régulation du couplage excitation-contraction ont permis de préciser les bases moléculaires responsables des modifications cellulaires observées. Pour le détail des méthodes, voir : André et al., 2009 ([Réf. 10]).

Résultats scientifiques

Les résultats montrent que la pollution chronique au CO pendant 4 semaines conduit à des changements modérés, mais significatifs, de la morphologie et de la fonction du myocarde. Les rats du groupe CO présentent une augmentation du rapport VG / poids du corps, traduisant une hypertrophie cardiaque. Chez ces animaux, on note en particulier une augmentation de la fibrose interstitielle et une fibrose périvasculaire au niveau du VG, ainsi que des signes de stress et de remodelage cardiaque localisés, avec une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire postérieure.

Au niveau cellulaire, les cardiomyocytes ne changent pas de dimension (pas d'hypertrophie cellulaire) mais leur fonction est altérée, à la fois au niveau de la phase de contraction et de relaxation (Figure 1). Ces altérations sont corrélées à une diminution de l'amplitude du signal

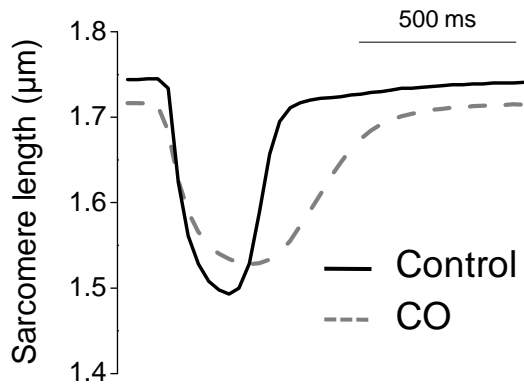


Figure 1 : Contraction de myocytes intacts, mesurée par le raccourcissement de la longueur des sarcomères à 0,5 Hz. Les cardiomyocytes ont été isolés de cœurs de rats exposés à une pollution chronique au CO (CO, ligne pointillée grise) et de rats témoins (trait plein noir). Reproduit d'après André et al., 2009 [Réf. 10].

calcique transitoire et de la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+} , deux paramètres qui déterminent la force de la contraction cellulaire. L'exposition chronique au CO induit également une altération de la phase de repompage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS); ce qui résulte en une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire diastolique (Figure 1) et, de manière concomitante, en une diminution du contenu en Ca^{2+} du RS comme cela a été déterminé par un test de « vidange » calcique de ce compartiment

par un test à la caféine (10 mM). Deux mécanismes peuvent expliquer une diminution du contenu calcique du RS : (i) une diminution de la capacité de stockage du Ca^{2+} dans le RS *via* la pompe SERCA-2a ; et/ou, (ii) une fuite de ce compartiment *via* les canaux de libération du Ca^{2+} (récepteurs à la ryanodine : RyR2).

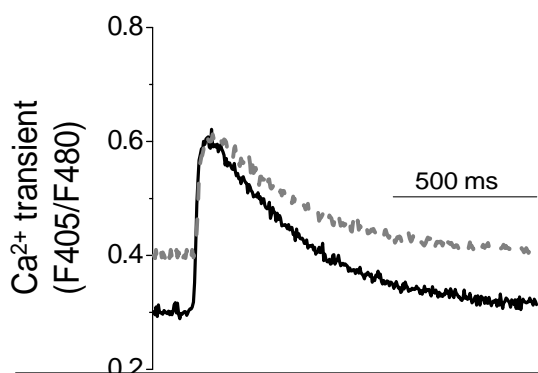


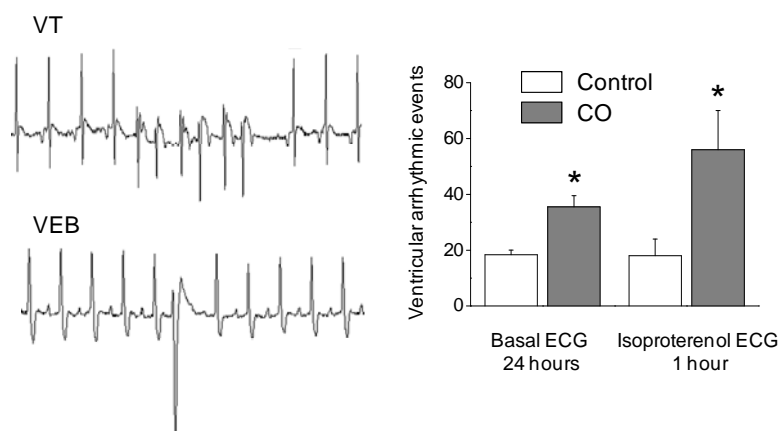
Figure 2 : Transitoires calciques de myocytes intacts, mesurée par imagerie de fluorescence, à 0,5 Hz. Les cardiomyocytes ont été isolés de cœurs de rats exposés à une pollution chronique au CO (CO, ligne pointillée grise) et de rats témoins (trait plein noir). Reproduit d'après André et al., 2009 [Réf. 10].

Nous avons déterminé que l'élévation du Ca^{2+} diastolique induite par une pollution chronique au CO est liée principalement à une diminution de l'expression de la SERCA-2a, mais aussi probablement à une fuite *via* le RyR2 comme suggéré par une hyperphosphorylation PKA-dépendante de ce récepteur (comme montré dans l'insuffisance cardiaque). Le niveau de phosphorylation de la protéine sarcomérique cTnI est également augmenté;

ce qui participe à diminuer la sensibilité de la machinerie contractile au Ca^{2+} et montre que l'exposition chronique au CO altère plusieurs étapes du couplage excitation-contraction

cellulaire. Ce phénomène d'hyperphosphorylation, ainsi que la diminution de différents paramètres mesurés *in vivo* et *in vitro*, suggère que les effets chroniques du CO pourraient impliquer un état « hyperadrénergique » modéré, bien connu pour son implication dans le développement de l'hypertrophie cardiaque, de la fibrose, de tachycardies, et les risques de mort subite cardiaque. D'autre part, nous avons mis en évidence un stress oxydatif chez la population de rats CO. De récentes données suggèrent un lien entre stress oxydatif et l'activité de kinases telle que la PKA. Il est donc possible que l'hyperphosphorylation PKA-dépendante des protéines RyR2 et TnI soit la conséquence d'une activation de la PKA par les espèces oxygénées réactives produites suite à l'exposition au CO.

Une élévation du Ca^{2+} diastolique, comme celle rapportée ici, est un facteur déclencheur d'arythmies cellulaires Ca^{2+} -dépendantes qui se traduisent, au niveau intégré, par la survenue d'extrasystoles ventriculaires, de tachycardies et éventuellement d'évènements arythmiques malins. Nous avons pu vérifier que l'exposition chronique au CO induit bien une augmentation des extrasystoles ventriculaires (Figure 3). Ce phénotype arythmique est exacerbé lors d'un stress β -adrénergique (stimulation à l'isoprotérénol).



Conclusion – Perspectives

L'exposition chronique au CO induit un phénotype pathologique au niveau cellulaire (cardiomyocytes) en l'absence de cardiopathie sous-jacente. Ce phénotype intègre

des altérations observées dans l'insuffisance cardiaque. Le phénotype *in vivo*, moins sévère que le phénotype cellulaire, suggère la mise en place de mécanismes compensateurs qui masquent – tout du moins pendant une pollution chronique limitée dans le temps (4 semaines) - les altérations observées au niveau des cardiomyocytes.

Si nos résultats sont extrapolables à l'homme, cette étude suggère que les effets néfastes de

Figure 3 : Exemples d'évènements arythmiques (VT: tachycardie ventriculaire; VEB: extrasystole ventriculaire) survenant lors d'enregistrements ECG de 24 heures (à gauche). Analyse de la

la pollution au CO seraient difficiles à détecter par des investigations cliniques de routine (échocardiographie, enregistrements ECG courts). Il sera important de voir dans quelles

conditions et après quelle durée d'exposition, les effets observés au niveau cellulaire entraînent des effets pathologiques *in vivo* plus sévères chez l'animal, puis chez l'homme. La pollution au CO dans nos villes est donc un facteur de risque important chez le sujet sain. Ce facteur de risque pourrait être révélé lors d'exercices physiques intenses prédisposant ainsi le sujet - même sain - à la survenue de troubles du rythme. Ce phénomène pourrait être largement majoré lors d'un stress additionnel (infarctus du myocarde par exemple) ou sur un substrat de cœur pathologique. Toute approche permettant de réduire l'activation β -adrénergique ou le stress oxydatif, tel que l'exercice physique, pourrait s'avérer efficace afin de prévenir les effets délétères de ce stress environnemental.

Publication réalisée et celles en perspective à court terme

Ce travail, qui a impliqué toutes les équipes participantes au projet déposé initialement, sera publié à *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* qui est un très bon journal de recherche translationnelle permettant de relier problématiques cliniques et approches expérimentales (*Impact Factor: 9.1*)

Andre L, Boissière J, Reboul C, Perrier R, Meyer G, Zalvidea S, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O, Richard S. *Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodelling and ventricular arrhythmias in healthy rats. Am. J. of Resp. & Critical Care Medicine*, 2009, sous presse.

Plusieurs publications 'à suivre' sont en cours de rédaction (effets mécanistiques ; effets de la pollution au CO chez le rat insuffisant cardiaque ; effets du ré-entraînement). L'acceptation de la première publication conditionnait la mise en forme des suivantes qui seront soumises dans les 6 mois qui viennent.

Impact clinique possible :

La plupart des études portant sur les effets de la pollution atmosphérique permettent seulement d'établir des corrélations entre la qualité de l'air et des événements cardiovasculaires, mais ne fournissent pas beaucoup d'information sur les mécanismes

physiologiques impliqués en raison de contraintes techniques évidentes pour travailler au niveau cellulaire sur des sujets humains. Nos résultats fournissent ainsi des informations à l'échelon cellulaire et viennent ainsi appuyer les études épidémiologiques montrant des effets néfastes de la pollution au CO sur la fonction cardiaque dans la population en bonne santé.

Cette étude montre aussi que, dans des conditions compatibles avec les examens de routine pratiqués en clinique chez l'homme (échocardiographie, enregistrements ECG de courte durée), les effets délétères de l'exposition chronique au CO ne sont probablement pas détectables. Pourtant, même en l'absence de cardiopathie sous-jacente, les cardiomyocytes pourraient, comme chez le rat sain, développer un phénotype pathologique avec la survenue d'anomalies fonctionnelles fréquemment observées dès les premiers stades de l'insuffisance cardiaque.

Références bibliographiques

1. Miller, K. A., D. S. Siscovick, L. Sheppard, K. Shepherd, J. H. Sullivan, G. L. Anderson, and J. D. Kaufman. 2007. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 356(5):447-58.
2. Brook, R. D., B. Franklin, W. Cascio, Y. Hong, G. Howard, M. Lipsett, R. Luepker, M. Mittleman, J. Samet, S. C. Smith, Jr., and I. Tager. 2004. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 109(21):2655-71.
3. Finkelstein, M. M. 2002. Pollution-related mortality and educational level. *Jama* 288(7):830; author reply 830.
4. Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, K. Ito, and G. D. Thurston. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* 287(9):1132-41.
5. Henry, C. R., D. Satran, B. Lindgren, C. Adkinson, C. I. Nicholson, and T. D. Henry. 2006. Myocardial injury and long-term mortality following moderate to severe carbon monoxide poisoning. *Jama* 295(4):398-402.
6. Samoli, E., G. Touloumi, J. Schwartz, H. R. Anderson, C. Schindler, B. Forsberg, M. A. Vigotti, J. Vonk, M. Kosnik, J. Skorkovsky, and K. Katsouyanni. 2007. Short-term effects of carbon monoxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Environ Health Perspect* 115(11):1578-83.
7. Peters, A., A. Doring, H. E. Wichmann, and W. Koenig. 1997. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 349(9065):1582-7.
8. Dales, R. 2004. Ambient carbon monoxide may influence heart rate variability in subjects with coronary artery disease. *J Occup Environ Med* 46(12):1217-21.
9. Simkhovich, B. Z., M. T. Kleinman, and R. A. Kloner. 2008. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 52(9):719-26.
10. Andre L, Boissière J, Reboul C, Perrier R, Meyer G, Zalvidea S, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O, Richard S. Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodelling and ventricular arrhythmias in healthy rats. *Am. J. of Resp. & Critical Care Medicine*, 2009, in press