



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 9609

To cite this version :

Jousserand, Nicolas. *Etablissement des valeurs de référence de l'électrocardiogramme du singe Cynomolgus (Macaca fascicularis) provenant de l'île Maurice*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 74 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

VALEURS DE RÉFÉRENCE DE L'ÉLECTROCARDIOGRAMME CHEZ LE SINGE CYNOMOLGUS (*Macaca fascicularis*)

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Nicolas, Pierre, Guy JOUSSERAND

Né, le 9 décembre 1987 à CAUDERAN (33)

Directeur de thèse : Mme Armelle DIQUÉLOU

JURY

PRESIDENT :

M. Jérôme RONCALLI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Armelle DIQUÉLOU

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Olivier DOSSIN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES (émérite)
M. C. PAVAUX	M. EECKHOUTTE	M. BRAUN (émérite)
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	M. TOUTAIN (émérite)
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

Remerciements

À notre président de Jury,

À Monsieur le Professeur Jérôme RONCALLI

Professeur des Universités - Praticien hospitalier

Service de Cardiologie générale et interventionnelle

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Nous vous prions d'accepter nos hommages respectueux

À notre Jury,

À Madame le Docteur Armelle DIQUÉLOU

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores

qui nous a fait participer à cette étude et qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse,

Veillez trouver l'expression de nos sincères remerciements

À Monsieur le Docteur Olivier DOSSIN

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie Médicale des Equidés et des Carnivores

qui nous a fait l'honneur de faire parti de notre jury de thèse,

Nous vous adressons notre plus sincère reconnaissance

À ma famille, qui m'a amené là où j'arrive aujourd'hui.

Que vous puissiez trouver dans ces quelques lignes, l'expression de toute ma reconnaissance et mon amour.

À *ma mère*, pour l'amour que tu m'a toujours donné, ton dévouement sans faille, pour m'avoir permis par tout ce que tu es et par tout ce que tu possèdes de réaliser mon rêve.

À *mon père*, pour l'ouverture d'esprit et la curiosité que tu m'as enseignées, pour l'excellence que tu as exigé de moi durant toutes mes études.

À *mon frère*, pour ton soutien indéfectible durant mon « exil toulousain », à ton talent de musicien et à la réussite que je te souhaite et à laquelle je crois.

À *mon grand-père*, pour m'avoir transmis ton goût des sciences, du travail, du sérieux et de la droiture.

À *ma grand-mère*, pour toute l'attention que tu m'as offerte et pour avoir cru en moi sans l'ombre d'un doute.

À *ma tante*, pour tous ces moments de mon enfance et ton appui permanent au cours des années (et non, tu ne m'auras pas transmis que ton goût pour les chefs-d'œuvre du cinéma français !).

À *mon grand oncle*, Robert Momas, que je n'ai connu que par le souvenir ému de ma famille, pour ton exemple et en mémoire d'une brillante vie stoppée trop tôt.

À mes amis,

À *François, Maxime et Olivier*, vous êtes pour moi le meilleur que j'emporterai en quittant cette Ecole ; à la joie que j'éprouve en imaginant les futurs moments que nous partagerons encore.

À *notre groupe « d'enfoirés » de l'ENVT*, Alexandre, Tibor, Philippe, Mattias, François, Audrey, Arthur, Aurélien, Barbara et tous les autres. Pour tous nos moments passés durant ces cinq années, et les souvenirs pour la vie. Parce que l'on est la meilleure promotion. Denaud Toulouse 2013, poulots !

À *Sarah*, pour nos réunions qui n'en finissaient pas, nos discussions sur l'avenir du monde et tout ce qu'on a pu organiser pour occuper nos journées !

À *nos poulots*, nos dignes successeurs. Puissiez-vous profiter autant que nous, et au plaisir que l'on aura toujours à vous voir grandir.

À *mes co-internes*, pour cette aventure qui ne fait que commencer...

À mes amis de classe préparatoire, Julian, Tania, Augustin, Antoine et tous les autres, parce que l'on y a survécu et qu'en y repensant, on s'y est bien amusé.

À tous les étudiants, enseignants et personnels de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, pour cette belle institution dont nous sommes fiers de contribuer à écrire l'histoire :

**“SCOLA MOLE EXIGUA FUIT FANAM SED TERMINAT ASTRIS NEC EQUORUM
STUDIS QUAM OMNE SCIENCA MINOR”**

« L'école fut de petite taille mais sa renommée gagna l'univers, autant pour ses recherches chevalines que pour toutes autres sciences »

À Aure-Eline,

Pour nous deux, notre vie ensemble, le soleil de ton sourire, pour le bonheur que tu m'as offert. Parce que tu resteras celle que j'aime et parce que tu es la seule chose que je n'ai pas envie de partager.

Parce que Vétérinaire...

« Nous aurons le destin que nous aurons mérité »

Albert Einstein

« TANTAE MOLIS ERAT ROMANAM CONDERE GENTEM »

« Tant il était difficile de fonder l'empire romain »

Table des matières

Introduction	17
Partie I : <i>Macaca fascicularis</i> et l'électrocardiographie	20
I. <i>Macaca fascicularis</i> , modèle de recherche.....	20
1. Biologie du <i>Macaca fascicularis</i>	20
2. Reproduction.....	20
3. <i>Macaca fascicularis</i> en tant que modèle biologique.....	21
3.1. L'expérimentation animale : présentation.....	21
3.2. Utilisation du macaque en tant que modèle biologique en recherche biomédicale.....	22
3.3. Utilisation du singe <i>Cynomolgus</i> en toxicologie cardiaque.....	22
II. Construction d'un intervalle de référence	24
1. Recueil des données précédemment établies	24
2. Choix de la population de référence	24
3. Conditions pré-analytiques	26
4. Acquisition des données	26
5. Analyse statistique	26
6. Présentation et documentation de l'intervalle de référence	29
III. Données bibliographiques de l'ECG chez <i>Macaca fascicularis</i>	29
1. Méthodes d'acquisition de l'ECG.....	29
2. Valeurs de références de l'ECG.....	30
2.1 Etat des lieux	30
2.2 Critiques des valeurs de la littérature	30
2.3 Facteur des variations pré-analytiques	31

Partie II : Etablissement des intervalles de référence des paramètres de l'électrocardiogramme chez *Macaca fascicularis*.

I.	Matériels et méthodes	33
	1. Population de référence	33
	1.1. Critères d'inclusion	33
	1.2. Critères d'exclusion	34
	2. ECG	34
	2.1. Réalisation des ECG	34
	2.2. Préparation des ECG sélectionnés	35
	2.3. Lecture des ECG	36
	2.4. Enregistrement, vérification et stockage des résultats	36
	2.5. Statistiques	37
II.	Résultats	38
	1. Population de référence	38
	2. Variabilité des lecteurs	38
	3. Fréquence cardiaque	39
	4. Valeurs d'amplitude et de durée de l'ECG	40
	5. Détection de troubles du rythme	42
	6. Comparaison des lectures des ECG par différents lecteurs	44
	7. Axe électrique du cœur	46
	8. Effet du sexe sur les paramètres de l'ECG	47
III.	Discussion	48
	1. Population de référence	48
	2. Résultats	49
	3. Comparaison avec les valeurs de la littérature	50
	4. Perspectives	51
	Conclusion	53

Bibliographie	57
Annexes	61
1. Exemple d'un tracé utilisé pour la lecture	61
2. Modèle de fiche de lecture d'un tracé électrocardiogramme	62
3. Sexe des Cynomolgus de la population de référence	63
4. Distributions des paramètres mesurés de l'ECG des Cynomolgus sur DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF.....	67

Tables des figures et tableaux

• Figures

1. Tracé type d'un électrocardiogramme	36
2. Corrélations entre les différentes mesures réalisées par deux lecteurs sur 10 ECG	45
3. Diagramme de l'axe cardiaque de référence du Cynomolgus avec les valeurs calculées par Référence Value Advisor	46

• Tableaux

1. Données biologiques de la reproduction de <i>Macaca fascicularis</i>	21
2. Critères d'inclusion couramment utilisés pour le choix d'une population de référence.....	25
3. Moyennes des coefficients de variation obtenus pour les 6 dérivations par un lecteur expérimenté (e) ou non expérimenté (n) lisant 5 fois 10 ECG (différents suivant les lecteurs).....	39
4. Intervalle de référence de la fréquence cardiaque du Cynomolgus calculé par Reference Value Advisor	40
5. Statistiques des paramètres de l'ECG du Cynomolgus sur 6 dérivations ..	41
6. Intervalles de référence des paramètres de l'ECG du Cynomolgus sur 6 dérivations calculés par Reference Value Advisor.....	43
7. Intervalle de référence de l'axe cardiaque du Cynomolgus calculé par Reference Value Advisor.....	46
8. Résultats du test de Mann-Whithney (p-value) comparant les données de l'ECG sur 6 dérivations entre les mâles et les femelles.....	47
9. Intervalles de références des spécifiques des mâles et femelles pour les données sexe-dépendantes de l'ECG, calculés par Référence Value Advisor.....	48

Introduction

En France, 84% des animaux utilisés à des fins de recherche scientifique sont des rongeurs. Parmi les autres espèces animales utilisées, nous pouvons citer le lapin (4.1%), les amphibiens (0.4%) les carnivores (0.3%), et les primates (0.1%) [9]. Ces modèles biologiques sont principalement utilisés dans les domaines de la biologie fondamentale et en tant que modèle pour les médecines humaine et vétérinaire, la production et le contrôle de médicaments, les études de sécurité, l'enseignement et le diagnostic.

Les primates non humains (PNH) font partie intégrante du panel de modèles animaux disponibles pour l'expérimentation animale. Leur grande proximité phénotypique et génotypique avec l'Homme en fait un modèle de choix pour certaines maladies humaines. Parmi les plus connues, le SIDA, les hépatites, le diabète sucré ou encore l'athérosclérose ont pu être mieux connues par la participation des PNH à des travaux de recherche.

Aujourd'hui, le recours à de nombreuses méthodes dites alternatives a permis de réduire massivement le nombre de primates utilisés en recherche. La réglementation devenant également très stricte encadre rigoureusement l'utilisation d'animaux, en particulier les singes. Leur utilisation reste limitée du fait des contraintes éthiques et écologiques. De manière à garantir une traçabilité, garante de la protection de l'espèce, les animaux proviennent uniquement d'élevages accrédités.

Le singe *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) est particulièrement utilisé comme modèle en toxicologie notamment cardiaque. Lors de ces études, l'électrocardiogramme (ECG) est fréquemment utilisé comme indicateur du système cardiovasculaire et des répercussions possibles d'un principe actif. Ceci se réalise soit en comparant l'ECG post-administration de la substance avec l'ECG témoin de l'individu, soit en comparant les valeurs de l'ECG avec des intervalles de référence préalablement établis, cette dernière technique étant plus fiable. Cependant, les données portant sur les ECG de *Cynomolgus* sains sont rares, anciennes ou établies à partir de populations relativement restreintes (une seule publication en 1986 [3]).

Or les notions d'intervalles de référence et les outils statistiques ont considérablement évolué durant ces dernières années.

L'objectif de ce travail est donc de dresser les intervalles de référence de l'électrocardiogramme (dérivations DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF) du singe *Cynomolgus (Macaca fascicularis) a posteriori* à partir d'un lot de 164 animaux provenant de l'île Maurice.

Nous étudierons dans une première partie le contexte scientifique avec la justification du modèle et les recommandations internationales pour la détermination d'un intervalle de référence. Dans un second temps, nous décrirons le protocole et les résultats de notre étude et nous terminerons par une discussion sur les intervalles de référence obtenus.

Partie I : *Macaca fascicularis* et l'électrocardiographie

I. *Macaca fascicularis*, modèle de recherche

Macaca fascicularis possède plusieurs noms courants : singe Cynomolgus, macaque crabier ou encore macaque à longue queue. Son utilisation en recherche biomédicale est courante parmi les primates non humains.

1. Biologie et comportement de *Macaca fascicularis*

Macaca fascicularis est un singe de petite taille (plus petit que *Macaca mulatta*). Un dimorphisme sexuel existe, les mâles étant plus lourds que les femelles. La caractéristique principale distinguant le Cynomolgus des autres macaques est sa longue queue non préhensile pouvant atteindre 65 cm.

Le singe Cynomolgus est réputé pour être plus stressé par les manipulations courantes par rapport aux autres primates non humains d'expérimentation, ce qui le rend plus agressif que le singe Rhésus [37].

2. Reproduction

La reproduction du singe Cynomolgus est relativement simple et rapide, ce qui le rend particulièrement propice à l'élevage. En captivité, les Cynomolgus peuvent en effet s'accoupler tout au long de l'année, alors qu'en liberté la femelle n'accepte le mâle que sur des périodes discrètes. La reproduction n'est pas saisonnière chez *Macaca fascicularis* contrairement au macaque rhésus (*Macaca mulatta*). Les principales caractéristiques de la reproduction du singe Cynomolgus sont résumées dans le tableau 1 [37].

Tableau 1 : Données biologiques de la reproduction de *Macaca fascicularis*

Age de la maturité sexuelle	entre 3 à 4 ans
Age de mise à la reproduction	entre 4 et 5 ans
Cycle menstruel	31 jours
Durée de la gestation	153 à 179 jours (moyenne de 167 jours)
Intervalle naissance - naissance	1,1 an
Nombre de nouveau-nés par portée	1
Poids à la naissance	0,33 à 0,35 kg
Age de sevrage	12 mois

Or la facilité d'élevage est un élément clé dans le choix d'une espèce de singe destiné à l'expérimentation animale. En effet, *Macaca fascicularis*, comme les autres primates, est inscrit au Programme 2 de l'*Animals Scientific Procedure Act (ASPA)*, ne pouvant être acquis que par une structure agréée pour son élevage et son utilisation [36]. De plus, les primates figurent à l'annexe II de la CITES¹ au titre des espèces non menacées à l'heure actuelle, mais pouvant rapidement le devenir sans un contrôle strict de son commerce [6].

3. Le macaque *Cynomolgus* en tant que modèle biologique

3.1. L'expérimentation animale : présentation

En Europe, environ 12 millions d'animaux sont utilisés chaque année à des fins d'expérimentation [9], et 2.3 millions en France [14] (soit un animal pour 28 habitants). La prise en charge des animaux est soumise à des règles d'éthique et de bien être, dictées par la directive européenne 2010/63 [20] entrée en vigueur le 1^{er} janvier 2013, et modifiant la réglementation de 1987 [19]. La nouvelle directive insiste notamment sur la nécessité des comités d'éthique dans la validation des protocoles et procédures utilisés dans le cadre d'une expérimentation et sur le principe des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer – *Reduce, Refine, Replace*) instauré par Russel et Burch en 1959 (Russel and Burch, 1959).

¹ CITES : Convention sur le commerce international des espèces de la faune et de la flore menacées d'extinction, « Convention de Washington ».

De nouveaux modèles basés notamment sur la culture cellulaire existent, ayant principalement pour but de limiter voire de remplacer le recours aux animaux. Cependant, ces modèles montrent rapidement des limites lorsqu'il s'agit d'étudier les répercussions sur un organisme tout entier.

3.2. Utilisation du macaque en tant que modèle biologique en recherche biomédicale

Les espèces de macaques les plus utilisées en expérimentation animale sont *Macaca mulatta* (macaque rhésus), *Macaca fascicularis* (singe cynomolgus) et *Macaca nemestrina*. Le singe est principalement utilisé pour les études sur la vision, l'immunologie et les maladies neurodégénératives. Ces espèces en tant que modèles biologiques pour la recherche à destination humaine présentent l'avantage d'une grande proximité biologique avec l'Homme (plus de 99% de gènes en commun), d'où une extrapolation inter-espèce plus aisée qu'avec n'importe quelle autre espèce animale. Néanmoins, les contraintes éthiques et réglementaires imposées par la nouvelle réglementation ainsi que le coût de chaque animal poussent les unités de recherche à réduire au maximum le nombre de singes dans les expérimentations, ou à choisir d'autres modèles biologiques.

Macaca fascicularis est plus particulièrement utilisé en recherche pharmacologique. Entre 2012 et 2013, 13 articles faisant état de protocole utilisant le singe Cynomolgus comme modèle sont parus dans le *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. L'*European Journal of Pharmacology* fait état de 176 publications où le Cynomolgus est cité comme modèle entre 1975 et 2013 [31].

3.3. Utilisation du singe Cynomolgus en toxicologie cardiaque

En toxicologie cardiaque expérimentale, de nombreuses études utilisent le singe Cynomolgus comme modèle pour les tests d'innocuité en phase préclinique selon les conseils de la Food and Drug Administration (recommandations aux industries pour les essais d'innocuité pharmacologique des médicaments humains [11]). La sécurité cardiovasculaire des médicaments doit en effet être éprouvée selon ces

recommandations par mesure de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et enfin d'un ECG, le but étant de détecter toute manifestation non désirée pouvant mettre en jeu les fonctions vitales (cardiaques, respiratoires et nerveuses centrales). Si le test d'innocuité ne comprend pas l'un de ces éléments, la justifier par des arguments scientifiques pertinents est obligatoire. Le contrôle du tracé ECG suite à l'administration d'un principe actif destiné *in fine* à l'Homme fait ainsi parti des étapes jugées fondamentales par la FDA.

L'électrocardiogramme (ECG) est en effet une méthode non invasive de mesure de l'activité électrique du cœur. Plusieurs anomalies peuvent être détectées : les anomalies de rythme, de conduction électrique du cœur (allongement de la durée de conduction, blocs atrio-ventriculaires), les modifications de la fréquence cardiaque. L'ECG est utilisé au moment de l'administration (toxicité aiguë) et peut également être réitéré par la suite pour étudier des éventuelles actions du produit sur la durée et en phase de récupération (toxicité chronique) [32].

Plusieurs éléments de l'électrocardiogramme sont analysés lors des études de toxicité cardiaque. On rencontre classiquement les durées QT, PR, QRS, PQ et RR (correspondant à la fréquence cardiaque). Les paramètres calculés sont aussi mentionnés, tels que la durée QTc (intervalle QT corrigé selon la formule de Bazett considérant l'intervalle RR [5]). Nous pouvons citer pour exemple une étude pharmacologique concernant 3 antagonistes des récepteurs H1 à l'histamine et leurs effets sur l'électrocardiogramme [25].

De nombreuses études de toxicologie cardiaque se limitent à la mesure de la durée QT [1]. La FDA considère ce paramètre comme bon indicateur des répercussions cardiovasculaires d'un principe actif [12]. L'intervalle QT est décrit dans la littérature comme marqueur d'arythmies et de possibles morts subites [29][33]. De nombreuses autres modifications cardiovasculaires sont possibles suite à l'action d'une substance médicamenteuse [4].

II. Construction d'un intervalle de référence

L'intervalle de référence (IR) est couramment utilisé en Biologie Médicale pour le dosage de différents analytes et la détection d'anomalies. Le concept est employé pour la première fois chez l'Homme en 1969 par Gräsbeck et Saris [15]. Un intervalle de référence d'un constituant est ainsi défini comme deux valeurs (une minimale et une maximale) encadrant 95% des valeurs du constituant étudié pour une population de base supposée saine (appelée population de référence). Ainsi, 2,5% des valeurs du constituant pour la population de référence sont inférieures à la valeur minimale de l'intervalle et 2,5% des valeurs sont supérieures à la valeur maximale.

Les intervalles de références sont particulièrement importants en Biologie Médicale et font l'objet de débats. Cependant, les concepts d'IR sont largement applicables à de nombreux autres domaines. L'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) a édité depuis 1970 un certain nombre de critères auxquels doivent répondre ces intervalles pour être jugés scientifiquement recevables. Le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) adhère à ces recommandations et a réalisé en 2008 une mise à jour des standards [8], validés par l'American Society for Veterinary Clinical Pathology. Selon elles, la création *de novo* d'intervalle de référence doit suivre 6 étapes.

1. Recueil des données précédemment établies

Il s'agit principalement de cibler les facteurs de variation connus ou suspectés, pouvant affecter les résultats à partir des études disponibles dans la littérature. A partir de ces informations, des critères d'inclusion et d'exclusion sont établis pour la population de référence. Les conditions pré-analytiques sont également déterminées.

2. Choix de la population de référence

La population de référence est supposée saine. Ainsi, il est indispensable de s'en assurer par des contrôles cliniques et biologiques. Pour l'animal de laboratoire, il est recommandé de tenir compte de la provenance et de la souche utilisée pour les

valeurs hématologiques [35]. Certains paramètres classiques sont cités à titre d'exemple dans le tableau 2.

Tableau 2 : Critères d'inclusion couramment utilisés pour une population de référence (d'après Friedrichs et coll. [2])

Catégorie	Critères
Biologique	Age
	Sexe
	Elevage
	Souche
	Fournisseur
Clinique	Historique
	Traitements préventifs
	Examen clinique
	Examens complémentaires (Biochimie, Hémogramme, etc.)
	Logement
Géographique	Localisation
	Environnement

Certains critères peuvent également être utilisés plus précisément pour définir des sous-populations permettant d'affiner les intervalles de référence (selon le sexe, l'âge, la provenance géographique, etc.). Les critères d'exclusion doivent éliminer tout animal dont l'état pourrait altérer ses fonctions physiologiques (gestation, animal stressé, sous traitement etc.) [26].

Une population d'au moins 120 individus est requise dans le cas où la distribution serait trop différente d'une courbe gaussienne et nécessiterait le recours à une méthode non paramétrique pour espérer un intervalle de confiance de 90% (Cf. infra). Certaines valeurs pouvant être aberrantes et retirées, il est recommandé de prévoir un effectif supérieur.

3. Conditions pré-analytiques

La méthode d'acquisition des résultats doit être standardisée. Il est indispensable de prévoir des procédures limitant au maximum les variations intra et interindividuelles (méthode de capture, ordre de prélèvement, utilisation de sédation, etc.).

Les procédures doivent prévoir la gestion des erreurs analytiques. L'erreur analytique se compose de l'erreur aléatoire (ou coefficient de variation [CV] ou encore imprécision) et de l'erreur systématique (biais). La première est déterminée par la mesure du caractère répétable des mesures sur le même échantillon. La seconde erreur décrit l'écart entre la valeur obtenue et la vraie valeur (obtenue quand cela est possible par une méthode qualifiée de « Gold Standard »). Dans ce travail, l'électrocardiogramme est la méthode de référence pour la mesure de l'activité électrique du cœur.

4. Acquisition des données

L'identification des données est réalisée selon une méthode définie, identique pour tous les individus. Les conditions de mesure et de saisie doivent être encadrées par une procédure stricte et jointe aux résultats. Les résultats nécessitent d'être vérifiés au fur et à mesure (contrôle de qualité). En effet, si une nouvelle mesure doit être effectuée, il est préférable qu'elle ait lieu immédiatement.

5. Analyse statistique

Une fois les valeurs de l'élément pour la population de référence acquises, la distribution doit être observée de préférence sous forme d'histogrammes, de façon à mettre en évidence les valeurs aberrantes.

L'étape suivante consiste à identifier les valeurs extrêmes (qualifiées de « outliers ») et de s'assurer de leur état. Il peut en effet s'agir :

- de l'inclusion erronée de sujet non sain ;
- d'une maîtrise insuffisante des conditions pré-analytiques ou d'une erreur analytique ou post-analytique.

Ces valeurs doivent être éliminées pour ne pas fausser le calcul des limites de l'intervalle. On peut alors avoir recours à 2 techniques principales pour identifier ces valeurs :

- L'algorithme de Horn [17], nécessitant que la distribution des valeurs suive une loi normale (avant ou après transformation). Cette méthode se base sur l'intervalle de Tukey défini comme $IQ = [Q1 - 1,5 \times IQR ; Q3 - 1,5 \times IQR]$. Avec IQR correspondant à l'intervalle interquartile, soit $IQR = IQ3 - IQ1$ où IQ3 est la valeur correspondant à 75% des valeurs et IQ1 est la valeur correspondant à 25% des valeurs. Une valeur extérieure à cet intervalle est considérée alors comme aberrante.
- La méthode selon Dixon [10] (Q test), indépendant de la loi de distribution, se base sur la définition suivante : est aberrante, une valeur pour laquelle l'inégalité $D / R > 0,3$ est respectée (D est la valeur absolue de la distance entre la valeur en question et la valeur située juste avant et R est la valeur absolue de la distance entre les 2 valeurs extrêmes de la population).

Le nombre de valeurs retirées doit être noté ainsi que les raisons pour lesquelles elles l'ont été. Le calcul statistique fait appel à différentes méthodes dont le choix se base sur la distribution des données. Globalement, deux cas de figure se présentent : soit la distribution est gaussienne (c'est-à-dire qu'elle suit une loi normale), soit la distribution est non gaussienne.

La méthode classique de détermination d'un intervalle de référence (dite méthode paramétrique) s'appuie sur une distribution gaussienne des valeurs du paramètre étudié. La normalité de la distribution est testée par la loi d'Anderson-Darling :

$$A = -N - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (2i - 1) [\ln F_i + \ln (1 - F_{N+1-i})]$$

F_i est la fréquence théorique de la loi de répartition normale centrée réduite. La valeur de A est comparée à une table ne dépendant pas de l'effectif et permettant de

déterminer la p-value qui doit être supérieure à 0,05 (hypothèse de normalité de la distribution non rejetée) [28].

Si les valeurs ne suivent pas une loi normale, il est possible d'avoir recours à une transformation pour se rapprocher d'une distribution gaussienne avec par exemple un logarithme ou la transformation de Box Cox, donnée ci-dessous.

$$B(x, \lambda) = \begin{cases} \frac{x^\lambda - 1}{\lambda} & \text{si } \lambda \neq 0 \\ \log x & \text{si } \lambda = 0 \end{cases}$$

Si malgré cette transformation, la loi de distribution n'est toujours pas gaussienne, on peut utiliser la méthode dite « robust » nécessitant cependant une symétrie dans la distribution des valeurs. Le choix le plus courant repose dans les autres cas de figure sur la méthode non-paramétrique. L'échantillon doit dans ce cas comprendre au moins 120 valeurs pour garantir la possibilité d'obtenir un indice de confiance de 90%. L'intervalle de référence englobe 95% des valeurs centrale de la population de référence, ainsi la borne inférieure est définie par le 2,5^{ème} centième et la borne supérieure est donnée par le 97,5^{ème} centième des valeurs la population de référence.

L'intervalle de confiance est utile pour les échantillons de grande taille afin de déterminer la précision des bornes supérieures et inférieures de l'intervalle de référence. Selon Boyd et Harris [8], il est recommandé que ces intervalles ne dépassent pas 20% de la longueur totale de l'intervalle de référence déterminé. Si tel est le cas, l'ajout de valeurs supplémentaires est suggéré.

Il peut être particulièrement intéressant de définir des sous-populations basées sur un aspect physiologique des individus de la population de référence dans un but d'homogénéité, par exemple selon le sexe ou l'âge. Ces sous-populations doivent contenir au moins 40 individus chacune. L'analyse statistique devra alors prendre en compte moyenne et écart type pour se livrer à une comparaison valable [18] [22].

6. Présentation et documentation de l'intervalle

L'intervalle de référence obtenu doit être accompagné des conditions d'établissements et des sujets de la population de référence (origine, caractéristiques biologique ou clinique, etc.).

III. Données bibliographiques de l'ECG chez *Macaca fascicularis*

1. Méthodes d'acquisition de l'ECG

Plusieurs techniques pour la réalisation d'un électrocardiogramme sont rapportées sur des animaux d'expérimentation et sur le *Cynomolgus* plus particulièrement. Une grande importance doit être accordée au choix de la méthode d'acquisition, celle-ci pouvant induire un ou plusieurs biais.

L'utilisation de la sédation est largement répandue permettant une manipulation plus aisée de l'animal, moins stressante et moins dangereuse pour l'expérimentateur. La réalisation de l'ECG devient comparable à celle des autres espèces domestiques (pinces crocodiles atraumatiques avec de l'alcool). Cependant, l'emploi de principes actifs anesthésiques peut avoir des répercussions sur la fonction cardiaque (notamment électrique) pouvant biaiser les résultats obtenus. Chez le chien, il s'agit d'un phénomène connu [34].

La télémétrie est une méthode d'intérêt pour les essais de longue durée sur les *Cynomolgus* participant à des études pharmacologiques. Le principe repose sur la pose chirurgicale de capteurs sous-cutanés ou intramusculaires. Cette méthode permet de limiter au maximum les manipulations contraignantes et de s'affranchir des interactions avec les substances anesthésiques. Des études récentes utilisent ce système [23]. Chaves et coll. ont montré l'intérêt et la fiabilité d'un modèle utilisant la télémétrie chez le *Cynomolgus* pour détecter une augmentation du segment PQ [7]. De plus, *l'ICH Guidelines for safety pharmacology testing* recommande autant que faire se peut, l'utilisation d'animaux vigiles dans les essais pharmacologiques [11].

La disposition des implants en intracardiaque s'avère en revanche moins utile et moins fiable. En effet, la complexité chirurgicale, le temps de récupération post-opératoire, le coût et l'inadéquation du tracé avec un tracé obtenu avec des capteurs sous-cutanés limitent l'utilisation de cette méthode dans les études pharmacologiques [38].

2. Valeurs de référence de l'ECG du Cynomolgus dans la littérature

2.1. Etat des lieux

Une seule publication datant de 1986 par Atkins et Dickie détermine des intervalles de référence d'électrocardiogrammes du singe Cynomolgus sédatisés à la kétamine sur un effectif de 100 individus [3]. Sont ainsi déterminés la durée et l'amplitude de P et T, la durée de PR, QRS, QT et l'amplitude de Q, R et S selon la seule dérivation DII. La fréquence cardiaque et l'axe cardiaque sont également calculés. Les résultats indiquent une distribution ne suivant pas une loi normale. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre mâle et femelle.

2.2. Critique des valeurs de la littérature

La constitution de la population de référence est peu précise. Les critères cliniques de bonne santé ne sont pas nommés, aucune analyse biologique n'est réalisée. Seule l'analyse macro et microscopique *a posteriori* du cœur post-mortem est mentionnée. La provenance des animaux n'est pas précisée, ce qui peut être un facteur de variation important.

Au niveau statistique, l'effectif est trop faible pour appliquer dans les meilleures conditions une méthode non paramétrique (un minimum de 120 individus est nécessaire pour garantir la possibilité d'obtenir un intervalle de confiance 90% sur les valeurs extrêmes de l'intervalle de référence). Les intervalles de confiance ne sont pas calculés. Aucun test de relecture pour déterminer la précision des mesures n'est pratiqué.

2.3. Facteurs de variations pré-analytiques

Peu d'études se sont intéressées aux facteurs physiologiques pouvant influencer l'électrocardiogramme de *Macaca fascicularis*. Ishizaka et col. ont étudié et démontré l'influence de l'âge sur la durée QT mesurée par télémétrie, uniquement chez les femelles [18].

Aucune étude chez le *Cynomolgus* n'a formellement démontré l'influence du sexe sur un tracé ECG, cependant chez l'Homme, il s'agit d'un facteur de variation connu [24][27]. Les cycles menstruels des femmes auraient également des effets sur l'intervalle QT [30].

Le but de notre étude est donc de calculer, suivant les recommandations internationales, l'intervalle de référence et les intervalles de confiance des données électrocardiographiques des singes *Cynomolgus* provenant d'un élevage situé dans l'île Maurice.

Partie II : Etablissement des intervalles de référence des paramètres de l'électrocardiogramme chez *Macaca fascicularis*

La réalisation d'intervalles de référence *a posteriori* se base sur des données recueillies entre 2009 et 2011.

I. Matériels et méthodes

1. Population de référence

Un minimum de 120 individus est nécessaire pour établir un intervalle de référence en s'affranchissant des méthodes de calcul statistique. Ce sont des singes qui ont été acquis auprès d'un élevage certifié dans l'île Maurice par un laboratoire afin de réaliser des études de toxicité cardiaque. Tous les singes acquis dans cette optique ont été soumis à un ECG avant inclusion et ces ECG ont été photocopiés et collectés afin d'être analysés pour ce travail.

1.1. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion *a posteriori* de la population de référence sont :

- Animaux de l'espèce *Macaca fascicularis*
- Historique médical vierge de toute affection
- Examen à distance sans anomalie
- Examen clinique sous sédation sans anomalie, comprenant :
 - o Examen des muqueuses ;
 - o Auscultation thoracique et mesure de la fréquence respiratoire ;
 - o Auscultation cardiaque et mesure de la fréquence cardiaque ;
 - o Palpation abdominale ;
 - o Mesure de la température rectale.
- Bilan biologique sans anomalie, comprenant :
 - o Hématologie (numération et formule)

- Biochimie (protéines totales, albumine, ALAT, PAL, créatinine)

Leur ECG est inclus si au moins 2 complexes P QRS T sont présents sur chacune des dérivations (DI, DII, DIII, aVR aVL aVF).

1.2. Critères d'exclusion

Les animaux sont exclus de la population de référence *a posteriori* lorsqu'ils répondent à une des conditions suivantes :

- Historique médical révélant une affection ;
- Au moins une anomalie à l'examen clinique à distance ou sous sédation ;
- Au moins une anomalie à l'examen biologique (au moins un paramètre sanguin en dehors des intervalles de référence du laboratoire).

Les ECG sont exclus de l'étude lorsqu'ils présentent au moins une des caractéristiques suivantes :

- Tracé présentant moins de deux complexes P QRS T sur au moins une dérivation ;
- Tracé de mauvaise qualité (variation de la ligne de base importante, qualité technique de la photocopie insuffisante pour effectuer la lecture avec précision). Dans ce dernier cas, tout l'ECG peut être exclu de l'étude si la majorité des tracés est de qualité insuffisante, ou seulement une ou plusieurs dérivations de qualité suffisante.

2. ECG

2.1 Réalisation des ECG

Les animaux sont sédatisés durant la réalisation du tracé. Ils sont placés à tour de rôle dans une salle adjacente à la salle d'hébergement, la contention est assurée par le même manipulateur à chaque mesure.

Les tracés sont réalisés avec l'électrocardiogramme Cardioline Delta 60 Plus. La vitesse est fixée à 50 mm/s et l'amplitude à 10 mm/mV.

2.2. Préparation des ECG sélectionnés

Les électrocardiogrammes des singes Cynomolgus examinés lors de leur arrivée au centre de recherche du laboratoire sont reproduits (photocopies de très bonne qualité, un exemple est présenté en annexe 1) et transmis à l'ENVT par courrier. Ils sont identifiés de ECG CM-1 à ECG CM-164 pour les ECG de macaques Cynomolgus provenant de l'île Maurice. Pour chaque individu, le sexe est noté.

2.3. Lecture des ECG

La technique de lecture des ECG est déterminée par un lecteur expérimenté, et transmise et validée sur plusieurs tracés avec un lecteur moins expérimenté qui réalise la lecture des 164 ECG. Tous les tracés ou dériviations posant problème sont relus par le lecteur expérimenté.

Une lecture rapide de tous les ECG est réalisée par le lecteur expérimenté pour identifier des irrégularités et/ou anomalies de tracé.

Les ECG sont lus à l'aide d'un compas suivant les critères suivants :

- P : amplitude, durée ;
- P-Q : durée du début de P au début de Q ;
- QRS : amplitude de R, durée du début de Q à la fin de S. Le cas échéant, amplitude de Q et de S ;
- QT : durée du début de Q à la fin de T ;
- T : amplitude, durée.

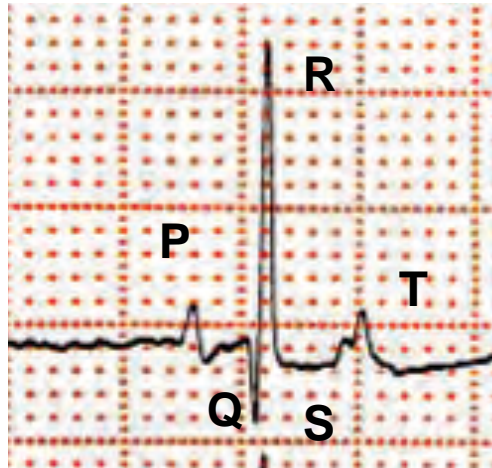


Figure 1 : Repères utilisés pour la lecture des ECG

Chaque donnée est lue sur un complexe, puis comparée avec la valeur d'au moins deux autres complexes. En cas de valeurs divergentes, la moyenne de ces valeurs est prise. En cas de tracé plus difficile à lire, ou lors de la relecture de valeurs « outliers », la lecture de l'élément posant problème est réalisée sur 5 complexes par le lecteur expérimenté et la moyenne de ces 5 mesures est retenue.

La fréquence cardiaque est calculée par comptage de chaque complexe PQRST sur une durée de 4 secondes (soit 20 cm de tracé). Le nombre obtenu est ensuite multiplié par 15 pour obtenir la fréquence cardiaque en battements par minute.

L'axe électrique du cœur est calculé à partir des valeurs en dérivation DI et DIII par sommation des vecteurs des complexes QRS et rapporté sur un diagramme (annexe 2).

2.4. Enregistrement, vérification et stockage des résultats

Les résultats de chaque lecture d'ECG (valeurs de chaque paramètre des complexes et leurs moyennes) sont notés dans une fiche spécifique (annexe 2).

La feuille est ensuite archivée, avec une copie de l'ECG auquel elle correspond, dans un classeur identifié « ECG Cynomolgus Ile Maurice » pour les ECG CM-1 à CM-164.

2.5. Statistiques

- Intervalles de référence

Les valeurs de chaque donnée de chaque dérivation de chaque ECG sont rentrées dans un tableau Excel. Elles sont ensuite transférées pour chaque dérivation dans le logiciel Reference Value Advisor. Il s'agit d'un logiciel permettant de calculer les intervalles de référence [13] à l'aide de plusieurs méthodes : la méthode paramétrique (dans le cas où les résultats suivent une loi normale), la méthode «robust» et ces deux mêmes méthodes après une transformation de Box Cox. Enfin, en l'absence de données dont la distribution se rapproche d'une courbe gaussienne, la méthode non paramétrique permet de fournir un résultat (son utilisation est rendue possible grâce à notre effectif supérieur à 120 individus). Le logiciel fournit la moyenne, la médiane et l'écart-type pour chaque paramètre. Les intervalles de confiance à 90% des bornes supérieures et inférieures de l'intervalle sont également calculés. La même méthode est employée pour la fréquence et l'axe cardiaque.

- Variabilité des résultats

Afin de déterminer l'erreur aléatoire (ou coefficient de variation [CV]), une épreuve de relecture en aveugle est réalisée : 10 tracés ECG différents pour chaque lecteur sont tirés au sort, grâce au site randomizer.org, rendus anonymes et lus selon la même méthode que précédemment. Les résultats, après levée de l'anonymat, sont reportés dans un tableur. Chaque lecteur effectue la lecture des ECG 5 fois. Entre chaque série de mesure, après remise en place de l'anonymat, les ECG sont mélangés de manière aléatoire. Les coefficients de variation de la mesure de chaque donnée sont calculés, ainsi que la moyenne des CV grâce au logiciel Microsoft Office Excel ® 2007 (Microsoft France).

- Comparaison des résultats entre lecteur

L'effet du lecteur est apprécié en réalisant la lecture par le lecteur expérimenté de 10 ECG également tirés au sort grâce au même site, et en comparant les résultats avec ceux obtenus par l'autre lecteur. Les résultats sont comparés en réalisant une

corrélation de Pearson et en utilisant le Sign test grâce au logiciel Analyse-it (Microsoft France). Nous avons choisi comme seuil de significativité $p < 0,05$.

II. Résultats

1. Population de référence

Après vérification des critères, à partir d'une population sélectionnée de 164 individus déclarés sains reçus par le laboratoire pharmaceutique entre 2009 et 2011 groupés en 6 lots, 158 tracés d'électrocardiogrammes ont été retenus soit 6 exclusions : 3 pour cause de photocopie de qualité insuffisante et 3 pour cause de variation de la ligne de base trop importante pour permettre une lecture fiable. Parmi les 158 ECG conservés, la dérivation DI n'était pas suffisamment nette pour 3 d'entre eux pour permettre une lecture de qualité, et n'a par conséquent pas été inclus dans nos résultats. La lecture a été cependant réalisée pour les 5 autres dérivations.

La population comprend 83 mâles et 81 femelles. Le sexe de chaque individu est indiqué par le tableau en annexe 3.

2. Variabilité des lectures

Les moyennes des coefficients de variations des différentes données de 10 ECG lus 5 fois par un lecteur expérimenté (e) ou non expérimenté (n) sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Moyennes des coefficients de variation obtenus pour les 6 dérivations par un lecteur expérimenté (e) ou non expérimenté (n) lisant 5 fois 10 ECG (différents suivant les lecteurs).

Donnée	Durée P	Amplitude P	Durée PQ	Durée QRS	Amplitude Q	Amplitude R	Amplitude S	Durée QT	Amplitude T
DI e	39.1	13.1	41.3	10.6	4.35	8.63	39.1	27.3	38.4
DI n	34.6	63.1	55.4	9.4	51.1	17	52.3	4.6	20.2
DII e	15.3	15.6	8.5	5.2	23	5	45	5.2	19.8
DII n	15.6	11.6	7.5	9.4	36.2	5.6	20.3	11	14.1
DIII e	12.5	19.9	6.1	4.2	23.2	5.7	45.9	65	67.4
DIII n	15.6	14.5	7.3	9.5	18.7	5.8	15.6	26.4	122.2
aVR e	21.8	39.2	16.2	4.2	20.8	8.7	26.1	49.1	51.6
aVR n	21.2	20.1	12.3	9.4	11.2	8.2	39.9	4.5	29.1
aVL e	102.3	105.6	96.6	6.6	47.6	6.1	15.1	3.9	14.1
aVL n	21.2	35.1	12.3	9.4	31.6	9.6	19.4	17.9	43.1
aVF e	19.6	12.2	6.4	2.9	10.6	3.9	27.9	62.5	114.1
aVF n	15.6	16.3	7.5	9.4	23.7	5.2	18.9	26.9	41.2

3. Fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque calculée varie entre 180 et 270 battements par minute (bpm). La moyenne est de 239 bpm avec une médiane de 240 bpm et un écart-type de 17,9 bpm.

La distribution des données ne suit pas une loi normale, même après la transformation de Box Cox (test d'Anderson-Darling, p-value < 0,05). Le logiciel Reference Value Advisor a calculé selon la méthode non paramétrique ; les résultats sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Intervalle de référence de la fréquence cardiaque du Cynomolgus calculé par Reference Value Advisor

	Minimum		Maximum	
Fréquence cardiaque (bpm)	194,6		270	
Intervalles de confiance à 90%	180	210	270	270

4. Valeurs d'amplitude et de durée de l'ECG

Les courbes de distribution des 10 paramètres mesurés sur les 6 dérivations sont présentées en annexe 4. Elles sont inspectées visuellement pour détecter les possibles valeurs aberrantes. Ces valeurs sont vérifiées par le lecteur expérimenté.

Les minimums, maximums, moyennes, médiane et écart-types de chaque paramètre sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Statistiques des paramètres de l'ECG du Cynomolgus sur 6 dérivations

		Amplitude P	Durée P	Durée PQ	Amplitude Q	Amplitude R	Amplitude S	Durée QRS	Durée QT	Amplitude T	Durée T
DI	Minimum	0,00	0,00	0,04	-0,15	-0,45	-0,25	0,03	0,12	-0,05	0,00
	Maximum	0,08	0,04	0,08	0,15	0,70	0,10	0,07	0,20	0,25	0,10
	Moyenne	0,03	0,02	0,06	-0,03	0,13	-0,04	0,05	0,17	0,09	0,06
	Médiane	0,03	0,02	0,06	-0,05	0,15	-0,05	0,05	0,16	0,10	0,06
	Ecart-type	0,02	0,02	0,01	0,05	0,19	0,05	0,01	0,01	0,04	0,01
DII	Minimum	0,05	0,02	0,04	-0,25	0,10	-0,40	0,04	0,12	-0,10	0,04
	Maximum	0,15	0,04	0,10	0,00	1,76	0,05	0,07	0,20	0,30	0,10
	Moyenne	0,10	0,03	0,06	-0,09	0,61	-0,09	0,05	0,17	0,11	0,06
	Médiane	0,10	0,03	0,06	-0,10	0,55	-0,05	0,05	0,16	0,10	0,06
	Ecart-type	0,03	0,01	0,01	0,06	0,31	0,07	0,01	0,01	0,08	0,01
DIII	Minimum	0,03	0,02	0,04	-0,30	-0,15	-0,55	0,04	0,12	-0,15	0,00
	Maximum	0,15	0,04	0,10	0,10	1,40	0,00	0,07	0,20	0,25	0,10
	Moyenne	0,08	0,03	0,06	-0,08	0,52	-0,08	0,05	0,17	0,03	0,06
	Médiane	0,10	0,03	0,06	-0,05	0,50	-0,05	0,05	0,17	0,05	0,06
	Ecart-type	0,03	0,01	0,01	0,06	0,30	0,08	0,01	0,01	0,08	0,02
aVR	Minimum	-0,10	0,00	0,04	-0,05	-1,00	-0,15	0,04	0,12	-0,25	0,00
	Maximum	0,05	0,06	0,10	0,15	1,05	0,35	0,07	0,20	0,05	0,10
	Moyenne	-0,06	0,03	0,06	0,06	-0,32	0,06	0,05	0,17	-0,10	0,06
	Médiane	-0,05	0,03	0,06	0,05	-0,30	0,05	0,05	0,16	-0,10	0,06
	Ecart-type	0,03	0,01	0,01	0,03	0,26	0,05	0,01	0,01	0,05	0,01
aVL	Minimum	-0,05	0,00	0,04	-0,10	-0,75	-0,10	0,04	0,12	-0,10	0,00
	Maximum	0,01	0,04	0,08	0,17	0,70	0,30	0,07	0,20	0,15	0,10
	Moyenne	-0,04	0,02	0,06	0,04	-0,20	0,03	0,05	0,17	0,03	0,06
	Médiane	-0,05	0,03	0,06	0,05	-0,20	0,03	0,05	0,16	0,05	0,06
	Ecart-type	0,02	0,01	0,01	0,05	0,22	0,05	0,01	0,01	0,06	0,02
aVF	Minimum	0,00	0,00	0,04	-0,25	-0,70	-0,30	0,04	0,12	-0,15	0,00
	Maximum	0,15	0,04	0,10	0,17	1,50	0,10	0,07	0,20	0,25	0,10
	Moyenne	0,09	0,03	0,06	-0,08	0,54	-0,07	0,05	0,17	0,06	0,06
	Médiane	0,10	0,03	0,06	-0,05	0,55	-0,05	0,05	0,17	0,05	0,06
	Ecart-type	0,03	0,01	0,01	0,06	0,34	0,07	0,01	0,01	0,08	0,01

La distribution d'aucune donnée sur aucune dérivation ne suit une loi normale selon le test d'Anderson-Darling (P-value < 0,05). Après transformation de Box Cox, la distribution reste significativement différente d'une courbe gaussienne. La taille de

l'échantillon le permettant, les données sont traitées selon une méthode non paramétrique. Les intervalles de référence ainsi déterminées et accompagnées des intervalles de confiance de chaque borne et le nombre de tracés utilisés sont présentés dans le tableau 6.

5. Détection de troubles du rythme

Un tracé ECG (CM-33) a présenté une extrasystole ventriculaire gauche isolée. Un ECG (CM-160) ayant une durée P-Q supérieure aux autres ECG (0,10 s, tous les autres étant $\leq 0,08$ s), un bloc atrio-ventriculaire de grade 1 est hautement probable chez cet animal.

Tableau 6 : Intervalles de référence des paramètres de l'ECG du Cynomolgus sur 6 dérivations calculés par Reference Value Advisor (amplitude en mV, durée en s)

		Amplitude P				Durée P				Durée PQ				Amplitude Q				Amplitude R			
		Min		Max		Min		Max		Min		Max		Min		Max		Min		Max	
DI	N	156				156				95				157				157			
	IR	0,00		0,05		0,00		0,04		0,04		0,08		-0,10		0,10		-0,25		0,45	
	IC 90%	0,00	0,00	0,05	0,08	0,00	0,00	0,04	0,06	0,04	0,05	0,08	0,08	-0,15	-0,10	0,05	0,15	-0,45	-0,25	0,40	0,70
DII	N	157				157				157				158				158			
	IR	0,05		0,15		0,02		0,04		0,05		0,08		-0,25		0,00		0,15		1,35	
	IC 90%	0,05	0,05	0,15	0,15	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04	0,05	0,07	0,10	-0,25	-0,20	-0,05	0,00	0,10	0,20	1,30	1,76
DIII	N	157				157				157				158				158			
	IR	0,05		0,15		0,02		0,04		0,04		0,08		-0,25		0,00		0,10		1,10	
	IC 90%	0,03	0,05	0,15	0,15	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04	0,05	0,07	0,10	-0,30	-0,20	0,00	0,10	-0,15	0,15	1,10	1,40
aVR	N	157				157				156				158				158			
	IR	-0,10		0,00		0,02		0,04		0,05		0,08		0,00		0,15		-0,80		0,30	
	IC 90%	-0,10	-0,10	-0,03	0,05	0,00	0,02	0,04	0,06	0,04	0,05	0,07	0,10	-0,05	0,03	0,15	0,15	-1,00	-0,65	-0,05	1,05
aVL	N	153				153				131				157				157			
	IR	-0,05		0,00		0,00		0,04		0,04		0,08		-0,10		0,15		-0,60		0,30	
	IC 90%	-0,05	-0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,04	0,04	0,04	0,05	0,07	0,08	-0,10	-0,05	0,10	0,17	-0,75	-0,50	0,20	0,70
aVF	N	157				157				156				158				158			
	IR	0,05		0,15		0,02		0,04		0,05		0,08		-0,20		0,10		-0,21		1,25	
	IC 90%	0,00	0,05	0,15	0,15	0,00	0,02	0,04	0,04	0,04	0,05	0,07	0,10	-0,25	-0,20	0,00	0,17	-0,70	0,15	1,15	1,50

		Amplitude S				Durée QRS				Durée QT				Amplitude T				Durée T			
		Min		Max		Min		Max		Min		Max		Min		Max		Min		Max	
DI	N	157				154				154				157				157			
	IR	-0,15		0,02		0,04		0,06		0,14		0,20		0,00		0,20		0,04		0,09	
	IC 90%	-0,25	-0,15	0,00	0,10	0,03	0,04	0,06	0,07	0,12	0,15	0,19	0,20	-0,05	0,03	0,15	0,25	0,00	0,05	0,08	0,10
DII	N	158				158				157				157				157			
	IR	-0,30		0,00		0,04		0,06		0,14		0,20		-0,05		0,25		0,04		0,09	
	IC 90%	-0,40	-0,25	0,00	0,05	0,04	0,04	0,06	0,07	0,12	0,15	0,19	0,20	-0,10	-0,05	0,25	0,30	0,04	0,05	0,08	0,10
DIII	N	158				158				153				158				158			
	IR	-0,35		0,00		0,04		0,06		0,14		0,20		-0,10		0,15		0,00		0,09	
	IC 90%	-0,55	-0,20	0,00	0,00	0,04	0,04	0,06	0,07	0,12	0,15	0,19	0,20	-0,15	-0,10	0,15	0,25	0,00	0,04	0,08	0,10
aVR	N	158				158				156				157				157			
	IR	0,00		0,20		0,04		0,06		0,14		0,20		-0,20		-0,02		0,04		0,09	
	IC 90%	-0,15	0,00	0,15	0,35	0,04	0,04	0,06	0,07	0,12	0,15	0,19	0,20	-0,25	-0,20	-0,05	0,05	0,00	0,05	0,08	0,10
aVL	N	157				157				149				156				156			
	IR	-0,05		0,10		0,04		0,06		0,14		0,20		-0,05		-0,10		0,00		0,09	
	IC 90%	-0,10	-0,03	0,10	0,30	0,04	0,04	0,06	0,07	0,12	0,15	0,19	0,20	-0,10	-0,05	0,10	0,15	0,00	0,00	0,08	0,10
aVF	N	158				158				156				157				157			
	IR	-0,25		0,00		0,04		0,06		0,14		0,20		-0,10		0,20		0,04		0,09	
	IC 90%	-0,30	-0,25	0,00	0,10	0,04	0,04	0,06	0,07	0,12	0,15	0,19	0,20	-0,15	-0,05	0,20	0,25	0,00	0,05	0,08	0,10

N : nombre de tracés utilisés ; IR : intervalle de référence ; IC 90% : intervalle de confiance à 90%

Pour tous les paramètres à l'exception d'un seul (durée de P en dérivation DII), les intervalles de confiance ne répondent pas aux exigences des recommandations internationales (l'étendue de l'intervalle de confiance est supérieure à 20% de l'étendue de l'intervalle de référence).

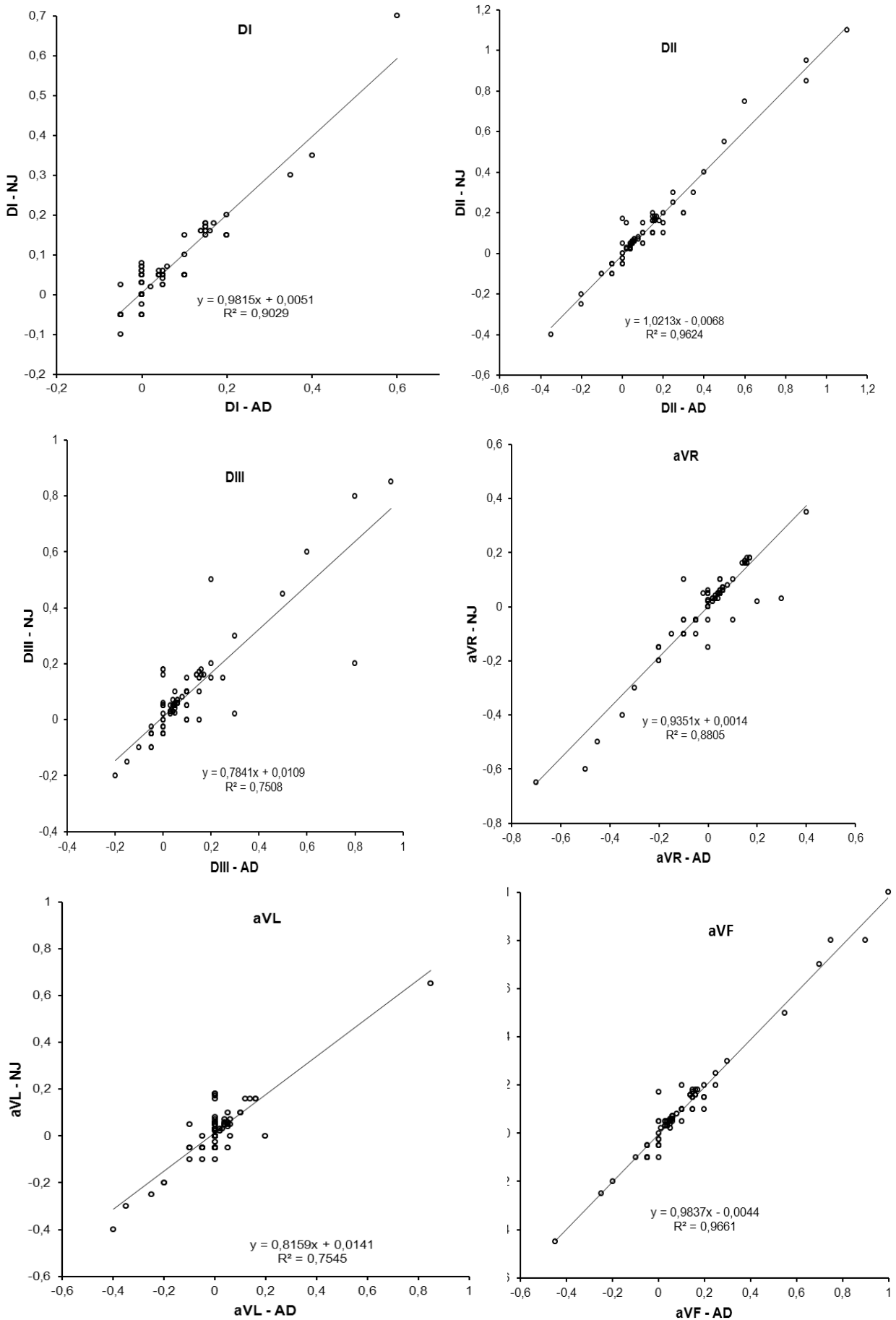
6. Comparaison des lectures des ECG par différents lecteurs

Effet du lecteur

La lecture de 10 ECG a donné des résultats différents suivant le lecteur pour les dérivations DI, aVR et aVL ($p < 0,05$).

Cependant, les résultats obtenus dans les 6 dérivations sont fortement et significativement corrélés ($p < 0,0001$) (figure 2).

Figure 2 : Corrélations entre les différentes mesures réalisées par 2 lecteurs sur 10 ECG



7. Axe cardiaque

Tous les tracés ECG pour lesquels les dérivations DI et DIII étaient interprétables ont été utilisés pour la mise en place de l'intervalle de référence de l'axe cardiaque, soit 156 tracés.

Les sommes algébriques des amplitudes des complexes QRS sur DI et sur DIII sont calculées avec un tableur Excel. Les intervalles de référence de l'angle de l'axe cardiaque sont calculés avec le logiciel Référence Value Advisor. La distribution des résultats ne suit pas une loi normale, une méthode non paramétrique est utilisée. Les résultats sont présentés dans le tableau 7. Le diagramme de l'axe cardiaque matérialisant l'intervalle de référence est présenté en figure 3.

Tableau 7 : Intervalle de référence de l'axe cardiaque du Cynomolgus calculé par Reference Value Advisor.

	Minimum		Maximum	
Axe cardiaque (°)	-61,1		147,2	
Intervalles de confiance à 90%	-144	-25	143	169

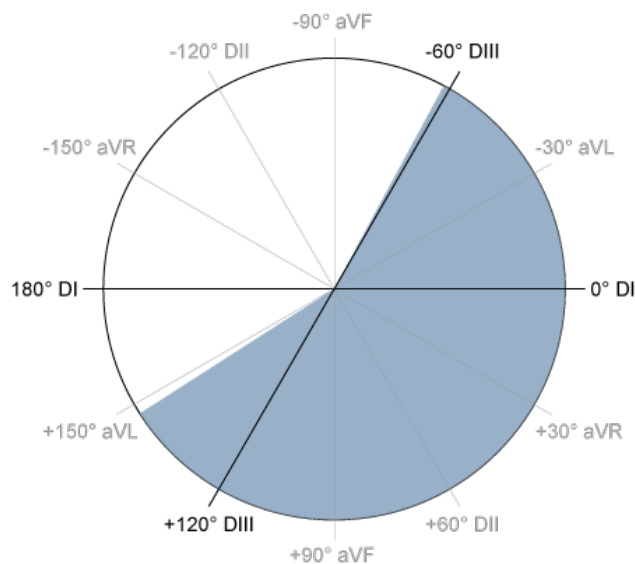


Figure 3 : Diagramme de l'axe cardiaque de référence du Cynomolgus avec les valeurs calculées par Référence Value Advisor

La zone bleue matérialise les angles inclus dans l'intervalle de référence déterminé.

8. Effet du sexe sur les paramètres de l'ECG

Afin de déterminer l'influence du sexe de l'individu sur les valeurs de référence de l'ECG, deux sous-populations sont constituées : la première comprenant les mâles (81 individus) et la seconde les femelles (83 individus). La distribution des données ne suivant pas une distribution normale, un test de Mann-Whitney est pratiqué (logiciel Minitab 16 Statistical Software®). Les résultats sont consignés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats du test de Mann-Whitney (p-value) comparant les données de l'ECG sur 6 dérivations entre les mâles et les femelles.

	Amplitude P	Durée P	Durée PQ	Amplitude Q	Amplitude R	Amplitude S	Durée QRS	Durée QT	Amplitude T	Durée T
DI	0,733	0,967	0,311	0,344	0,495	0,615	0,852	0,160	0,031	0,132
DII	0,732	0,712	0,055	0,004	0,128	0,005	0,749	0,198	0,887	0,291
DIII	0,822	0,712	0,060	0,040	0,070	0,148	0,645	0,126	0,138	0,394
aVF	0,694	0,737	0,068	0,120	0,248	0,131	0,658	0,168	0,231	0,186
aVL	0,467	0,441	0,047	0,171	0,093	0,877	0,833	0,169	0,087	0,320
aVR	0,922	0,930	0,042	0,125	0,474	0,405	0,749	0,206	0,285	0,288

Les cellules en surbrillance indiquent des paramètres pour lesquels un effet sexe est mis en évidence avec un risque $\alpha < 5\%$.

Seules 6 données de l'ECG sont influencées par le sexe : l'amplitude de T sur DI, l'amplitude Q sur DII et DIII, l'amplitude de S sur DII et la durée de PQ sur aVL et aVR (avec un risque $\alpha < 5\%$). Pour l'ensemble des autres données, aucun effet lié au sexe n'est mis en évidence sur notre population de référence.

Les intervalles de référence des données de l'ECG influencées par le sexe sont recalculés pour les deux sous-populations constituées des mâles d'une part et des femelles d'autre part. Les résultats pour chaque sous-population sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Intervalles de références spécifiques des mâles et femelles pour les données sexe-dépendantes de l'ECG calculés par Référence Value Advisor.

	Mâle				Femelle			
	Min		Max		Min		Max	
DI Amplitude T	-0,05		0,20		0,05		0,20	
<i>IC 90%</i>	-0,05	0,03	0,15	0,25	0,03	0,05	0,15	0,20
DII Amplitude Q	-0,25		0,00		-0,25		0,02	
<i>IC 90%</i>	-0,25	-0,20	-0,03	0,00	-0,25	-0,20	-0,05	0,00
DIII Amplitude S	-0,30		0,00		-0,36		-0,02	
<i>IC 90%</i>	-0,40	-0,24	0,00	0,05	-0,40	-0,26	-0,05	0,00
DIII Amplitude Q	-0,20		0,00		-0,26		0,01	
<i>IC 90%</i>	-0,25	-0,15	0,00	0,00	-0,30	-0,21	-0,02	0,10
aVL Durée PQ	0,14		0,20		0,14		0,19	
<i>IC 90%</i>	0,12	0,15	0,20	0,20	0,14	0,16	0,18	0,19
aVR Durée PQ	0,14		0,20		0,14		0,19	
<i>IC 90%</i>	0,12	0,16	0,19	0,20	0,14	0,16	0,18	0,19

III. Discussion

1. Population de référence

Dans ce travail, nous avons utilisé un effectif de 164 individus de singes *Cynomolgus* afin de déterminer les intervalles de référence de l'électrocardiogramme dans cette espèce. La population s'est avérée homogène en terme de répartition des sexes (52,5% de mâles pour 47,5% de femelles).

Notre population de référence est également homogène de par sa provenance unique (Ile Maurice). Il serait intéressant de réaliser la même étude sur un groupe d'individu équivalent provenant d'une autre région géographique et de comparer par la suite les résultats obtenus, et affirmer ou infirmer l'effet de la provenance des individus sur le tracé de l'électrocardiogramme.

Enfin, les données physiologiques précises de chaque individu (âge et poids) sont, dans cette étude, manquantes. Dans le même raisonnement que pour l'effet du sexe sur l'ECG, il serait intéressant de pouvoir étudier l'effet de ces facteurs sur les intervalles de référence.

2. Résultats

La variabilité de la lecture des ECG s'est révélée importante puisque les CV de beaucoup de mesures dépassent les 20%. L'expérience du lecteur ne semble pas intervenir sur les CV, ceux du lecteur expérimenté étant aussi élevés que ceux du lecteur moins expérimenté. Toutefois, il est intéressant de noter que les CV les plus élevés ont été obtenus lorsque certaines ondes, et notamment P ou T sont peu visibles : dans certaines lectures des valeurs leur ont été attribuées alors qu'elles étaient considérées non lisibles lors d'autres lectures.

Un autre point à souligner est qu'en DII, souvent utilisée comme dérivations de référence, tous les CV à l'exception de ceux de l'amplitude des ondes Q et S sont inférieures à 20% voire à 10%.

Enfin, les données particulièrement étudiées en toxicologie (durée PQ, durée QT, amplitude de R...) ont des CV bas, notamment en DII.

Bien que le nombre d'échantillons soit suffisant pour s'affranchir de contraintes statistiques, les intervalles de confiance à 90% des valeurs extrêmes des intervalles de référence sont trop importants par rapport aux recommandations internationales (supérieurs à 20% de l'étendue de l'intervalle). Il faut toutefois remarquer que ces recommandations s'adressent essentiellement à des données de biologie clinique, pour lesquelles les CV intra essais sont généralement faibles. La nature « humaine » de la lecture des données ECG, la précision nécessairement imparfaite de cette lecture ainsi que la difficulté de la lecture de certains tracés expliquent sans doute ceci. Il est en effet difficile, même à l'aide d'un compas, de déterminer une variation de durée de moins de 0,01 s ou une variation d'amplitude de 0,05 mV (représentant 0,5 mm sur le papier millimétré).

Le recours à une population plus importante serait intéressant pour essayer d'affiner les valeurs limites de l'IR.

De même, nous avons conservé ici des valeurs qui paraissent extrêmes voire que nous avons suspectées d'être anormales (individus présentant des anomalies cardiaques). Ces données n'ont pas été éliminées, répondant aux recommandations internationales « la tendance est à la conservation et non à la suppression ». La raison de cette décision est la suivante : les critères de sélection de notre population

sont les mêmes que ceux couramment utilisés par les laboratoires pharmaceutiques pour constituer un lot. Nous nous sommes ainsi placés dans les conditions courantes d'utilisation de ces intervalles. Toutes les valeurs extrêmes ont néanmoins été relues et validées par le lecteur expérimenté.

3. Comparaison avec les valeurs de la littérature

La comparaison des intervalles de référence des données de l'électrocardiogramme du Cynomolgus établis dans notre étude avec ceux dressés par Atkins et Dickie en 1986 [3] est difficile. En effet, la provenance géographique et les conditions pré-analytiques ne sont pas détaillées en totalité (leurs critères d'inclusion et d'exclusion notamment), les Cynomolgus sont par exemple sédatisés sans précision du protocole utilisé et qui est selon toute probabilité différent de celui utilisé dans cette étude. La lecture des tracés n'est réalisée que sur la dérivation II. Le traitement statistique n'est pas non plus comparable vu la plus faible taille de l'effectif réuni par l'étude précédente. Une simple comparaison numérique des données montre cependant des résultats assez proches de ceux établis dans notre étude. Certains intervalles de l'article sont plus larges et englobent ceux établis ici (amplitude de P, durée PQ, amplitude de Q, amplitude de S, durée de T). D'autres présentent des valeurs plus élevées (amplitude de R, amplitude de T, durée de QT) ou moins élevées (durée de QRS) par rapport à celles calculées ici et enfin, un intervalle est identique (durée de P). Toutefois, l'écart maximal entre les valeurs d'Atkins et les nôtres, pour un même paramètre, n'est jamais supérieur à 0,02 s pour les durées et à 0,25 mV pour les amplitudes.

Il est intéressant de noter qu'aucun effet du sexe n'avait été observé par Atkins et Dickie sur les données de l'ECG en DII, ce qui est contredit dans nos résultats par une différence significative entre mâles et femelles pour les amplitudes de 2 ondes (Q et R) sur la même dérivation.

4. Perspectives

Il serait particulièrement intéressant de réaliser la même étude sur une population équivalente, sélectionnée avec les mêmes critères d'inclusion et d'exclusion et d'une provenance géographique différente pour étudier l'éventuel effet sur les données de l'électrocardiogramme.

Il est également connu chez d'autres espèces, notamment chez le chien, que des facteurs liés à la manipulation des animaux peuvent faire varier les valeurs de l'ECG : effet manipulateur, rang de réalisation des ECG. Ces facteurs ne sont pas pris en compte dans cette étude et mériteraient d'être étudiés.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons établi les valeurs de référence des données de l'électrocardiogramme du singe Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) à partir d'une population de 158 individus provenant de l'île Maurice. Les étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques ont été établies en suivant les recommandations internationales d'établissement d'intervalle de référence *de novo*.

L'utilisation importante du Cynomolgus comme modèle de toxicologie cardiaque et de l'ECG comme méthode de détection d'effet cardiaque d'un principe actif a rendu nécessaire l'établissement de tels intervalles. Ceux-ci seront utilisables avec une population semblable à celle utilisée dans cette étude.

Certains paramètres de variations individuels ou liés à la manipulation (effet manipulateur, effet du rang de réalisation des tracés) restent à étudier et pourront faire l'objet d'études futures.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Armelle DIQUELOU, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **JOUSSERAND Nicolas** intitulée « **Valeurs de référence de l'électrocardiogramme chez le singe cynomolgus (*Macaca Fascicularis*)** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.




Fait à Toulouse, le 14 juin 2013
Docteur Armelle DIQUELOU
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



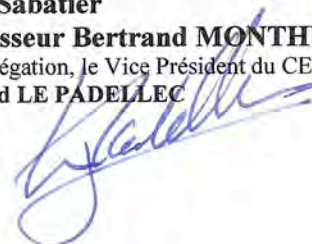
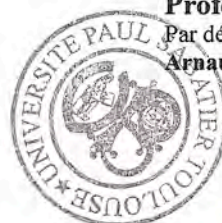

Vu :
**Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse**
Professeur Alain MILON

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jérôme RONCALLI



Professeur Jérôme RONCALLI
Praticien Hospitalier
Service de Cardiologie A
CHU Toulouse - Hôpital Rangueil
TSA 50032 - 31059 TOULOUSE Cedex 9
Tél. 05 61 32 33 34

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation, le Vice Président du CEVU
Arnaud LE PADELLEC



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.



Bibliographie

- [1] Ando, K., Hombo, T., Kanno, A., Ikeda, H., Imaizumi, M., Shimizu, N., Sakamoto, K., Kitani, S., Yamamoto, Y., Hizume, S., Nakai, K., Kitayama, T., Yamamoto, K., 2005. QT PRODACT: in vivo QT assay with a conscious monkey for assessment of the potential for drug-induced QT interval prolongation. *J. Pharmacol. Sci.* 99, 487–500.
- [2] Atkins, C.E., Dickie, B.C., 1986. Electrocardiogram of the clinically normal, ketamine-sedated *Macaca fascicularis*. *Am. J. Vet. Res.* 47, 455–457.
- [3] Authier, S., Tanguay, J.-F., Gauvin, D., Fruscia, R.D., Troncy, E., 2007. A cardiovascular monitoring system used in conscious cynomolgus monkeys for regulatory safety pharmacology. Part 2: Pharmacological validation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 56, 122–130.
- [4] Bazett, H.C., 1997. An Analysis of the Time-Relations of Electrocardiograms. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 2, 177–194.
- [5] Bernacky, B.J., Gibson, S.V., Keeling, M.E., Abee, C.R., 2002. Non Human Primates, in: James G. Fox, Lynn C. Anderson, Franklin M. Loew and Fred W. Quimby A2 - James G. Fox, L.C.A., Fred W. Quimby (Eds.), *Laboratory Animal Medicine (Second Edition)*. Academic Press, Burlington, pp. 675–791.
- [6] Center for Biologics Evaluation and Research, 2004. Guidances - S7B Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals [WWW Document]. URL <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm129121.htm> (accessed 8.25.13).
- [7] Chaves, A.A., Keller, W.J., O'Sullivan, S., Williams, M.A., Fitzgerald, L.E., McPherson, H.E., Goykhman, D., Ward, P.D., Hoe, C.M., Mixson, L., Briscoe, R.J., 2006. Cardiovascular monkey telemetry: sensitivity to detect QT interval prolongation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 54, 150–158.
- [8] Commission Européenne, 1986. Directive du conseil (86/609/CEE) du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques [WWW Document]. URL http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eec_fr.pdf (accessed 5.10.13).

[9] Commission Européenne, 2010a. Rapport de la commission au conseil et au parlement [WWW Document]. URL eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2010:0511:FIN:FR:PDF (accessed 5.17.13).

[10] Commission Européenne, 2010b. Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques [WWW Document]. URL <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:fr:PDF> (accessed 8.15.13).

[11] Dixon, W.J., 1953. Processing Data for Outliers. *Biometrics* 9, 74.

[12] Elsevier, B., 2013. ScienceDirect, base de données d'articles de journaux scientifiques [WWW Document]. URL <http://www.sciencedirect.com/>

[13] Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F., Blanco-Chavez, J., 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet. Clin. Pathol. Am. Soc. Vet. Clin. Pathol.* 41, 441–453.

[14] Gary, L., Horowitz, M., 2008. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

[15] Geffré, A., Concordet, D., Braun, J.-P., Trumel, C., 2011. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet. Clin. Pathol. Am. Soc. Vet. Clin. Pathol.* 40, 107–112.

[16] Gräsbeck, R., Saris, N., 1969. Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Lab Invest* 26, 62–63.

[17] Hamlin, R.L., Kijawornrat, A., Keene, B.W., Hamlin, D.M., 2003. QT and RR intervals in conscious and anesthetized guinea pigs with highly varying RR intervals and given QTc-lengthening test articles. *Toxicol. Sci.* 76, 437–442.

[18] Harris, E.K., Boyd, J.C., 1990. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin. Chem.* 36, 265–270.

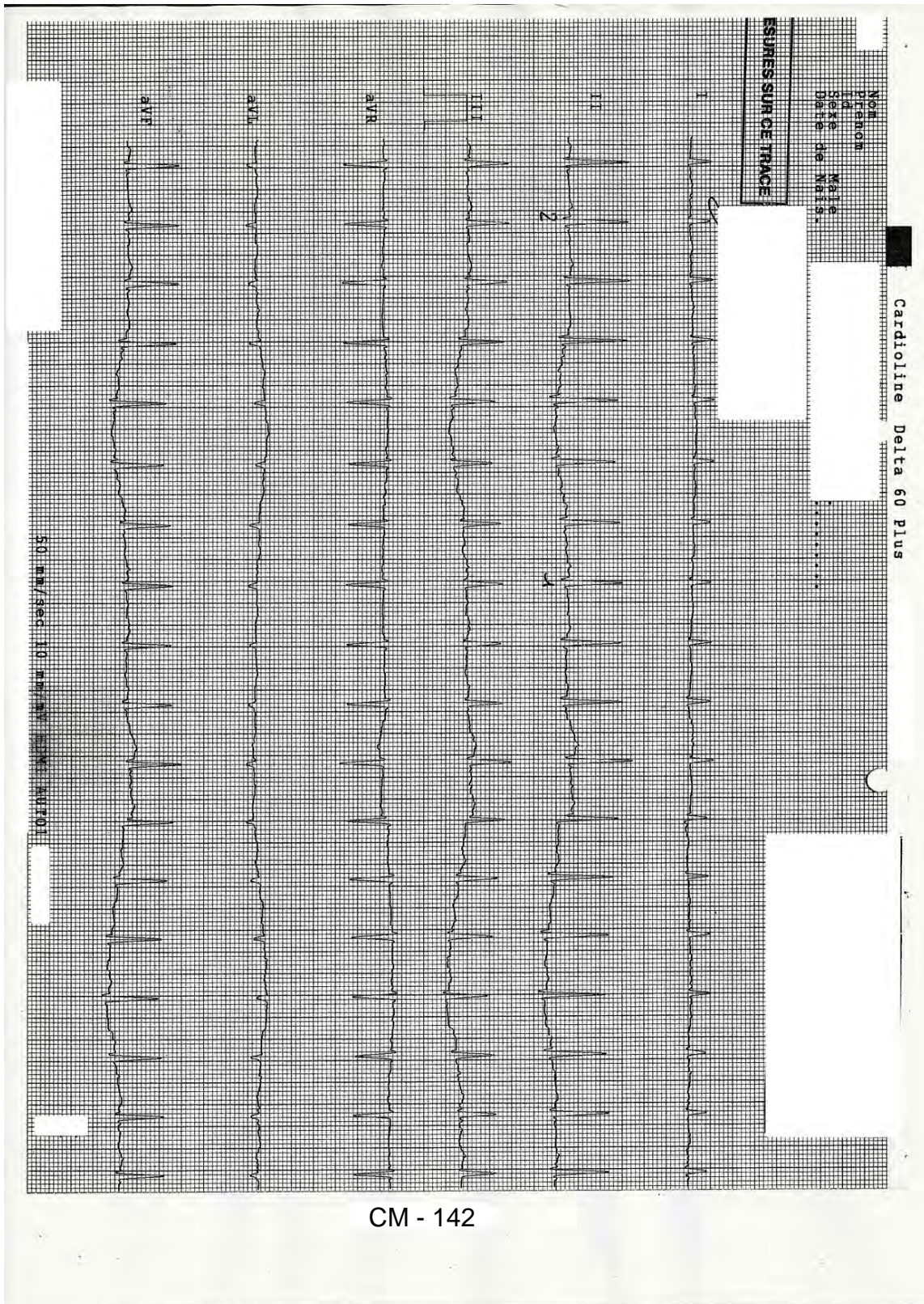
[19] Horn, P.S., Pesce, A.J., 2003. Reference intervals: an update. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 334, 5–23.

- [20] Ishizaka, T., Yoshimatsu, Y., Ozawa, M., Kimotsuki, T., Takasaki, W., Manabe, S., Yasuda, M., 2009. Age-related differences of QT interval and autonomic nervous system activity in female cynomolgus monkeys. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 60, 288–295.
- [21] King, F.A., Yarbrough, C.J., Anderson, D.C., Gordon, T.P., Gould, K.G., 1988. *Primates. Science* 240, 1475–1482.
- [22] Lachapelle, F., 2013. Groupe Interprofessionnel de Réflexion et de Communication sur la Recherche (GIRCOR) [WWW Document]. URL www.recherche-animale.org (accessed 5.17.13).
- [23] Lahti, A., Hytøft Petersen, P., Boyd, J.C., Fraser, C.G., Jørgensen, N., 2002. Objective criteria for partitioning Gaussian-distributed reference values into subgroups. *Clin. Chem.* 48, 338–352.
- [24] Lynch, J.J., 3rd, Wilson, A.W., Hernandez, L.E., Nelson, R.A., Marsh, K.C., Cox, B.F., Mittelstadt, S.W., 2008. Dose-response effects of sotalol on cardiovascular function in conscious, freely moving cynomolgus monkeys. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1439–1445.
- [25] Molnar, J., Zhang, F., Weiss, J., Ehlert, F.A., Rosenthal, J.E., 1996. Diurnal pattern of QTc interval: how long is prolonged? Possible relation to circadian triggers of cardiovascular events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 76–83.
- [26] Ohmura, T., Chachin, M., Tarui, S., Nagakura, A., Igarashi, T., Ikeda, H., Ikegami, K., Kitagawa, H., Uchida, S., 1999. Effects of terfenadine, astemizole and epinastine on electrocardiogram in conscious cynomolgus monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* 378, 169–175.
- [27] Poole, T., 1997. Happy animals make good science. *Lab. Anim.* 31, 116–124.
- [28] Rakotomalala, R., 2011. Tests de normalité, techniques empiriques et tests statistiques version 2.0 [WWW Document]. URL http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/cours/cours/Test_Normalite.pdf
- [29] Rautaharju, P.M., Manolio, T.A., Psaty, B.M., Borhani, N.O., Furberg, C.D., 1994. Correlates of QT prolongation in older adults (the Cardiovascular Health Study). Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *Am. J. Cardiol.* 73, 999–1002.
- [30] Robbins, J., Nelson, J.C., Rautaharju, P.M., Gottdiener, J.S., 2003. The association between the length of the QT interval and mortality in the Cardiovascular Health Study. *Am. J. Med.* 115, 689–694.

- [31] Saeki, Y., Atogami, F., Takahashi, K., Yoshizawa, T., 1997. Reflex control of autonomic function induced by posture change during the menstrual cycle. *J. Auton. Nerv. Syst.* 66, 69–74.
- [32] Surawicz, B., 1987. The QT Interval and Cardiac Arrhythmias. *Annu. Rev. Med.* 38, 81–90.
- [33] US Food and Drug Administration, 2001. ICH guidance for industry: S7A safety pharmacology studies for human pharmaceuticals [WWW Document]. URL <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074959.pdf>
- [34] Väisänen, M.A.M., Vainio, O.M., Raekallio, M.R., Hietanen, H., Huikuri, H.V., 2005. Results of 24-hour ambulatory electrocardiography in dogs undergoing ovariohysterectomy following premedication with medetomidine or acepromazine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 738–745.
- [35] Walker, M., Nelson, J., Bernal, J., Baskin, G., Gad, S.C, 2006. Primates, in: Gad, Shayne C. (2nd Ed.), *Animal Models in Toxicology*. CRC Press, p. 697.
- [36] Walton, R.M., 2001. Establishing reference intervals: Health as a relative concept. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* 10, 66–71.
- [37] Wolfensohn, S., Lloyd, M., 2013. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. 3rd Ed. Blackwell Publishing Ltd., p. 304.
- [38] Yao, J.-A., Feldman, H.S., Illenberger, A., Littell, T., Schnee, L., Yates, D., 2009. Evaluation of electrocardiograms recorded in cynomolgus monkeys with short- and long-term intracardiac lead implantations. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 60, 185–192.

Annexes

Annexe 1 : Exemple d'un tracé ECG utilisé pour la lecture



Annexe 2 : Modèle de fiche de lecture d'un tracé d'électrocardiogramme



LECTURE D'ECG CYNOMOLGUS ILE MAURICE

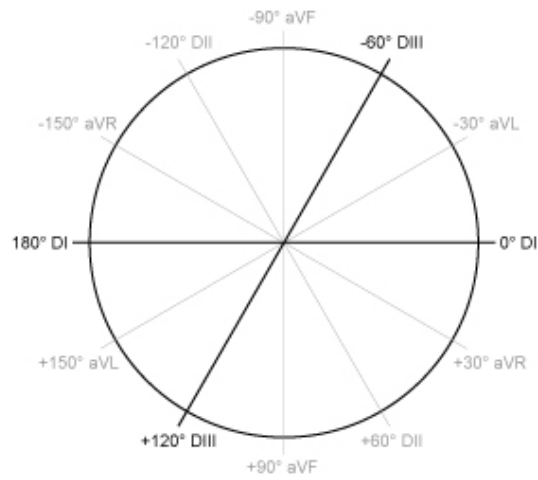
Identification

Date lecture

	Amplitude P	Durée P	Durée PQ	Amplitude Q	Amplitude R	Amplitude S	Durée QRS	Durée QT	Amplitude T	Durée T
DI										
DII										
DIII										
aVR										
aVL										
aVF										

Durée en s Amplitude en mV

Axe cardiaque



Annexe 3 : Sexe des Cynomolgus de la population de référence

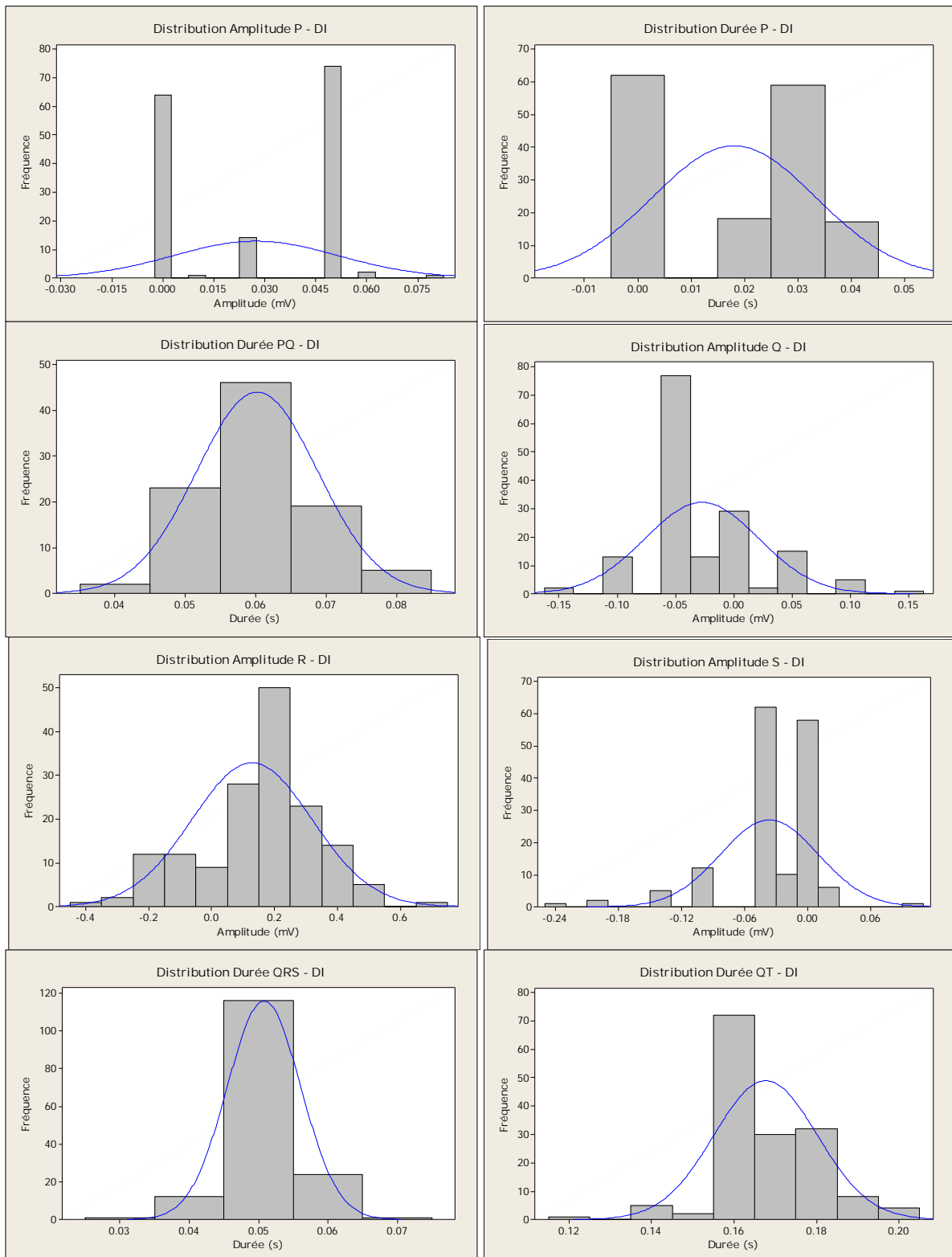
Etude	Identifiant	Sexe
Etude 6 2009 n=32	CM-1	Mâle
	CM-2	Mâle
	CM-3	Mâle
	CM-4	Femelle
	CM-5	Mâle
	CM-6	Femelle
	CM-7	Femelle
	CM-8	Femelle
	CM-9	Mâle
	CM-10	Mâle
	CM-11	Femelle
	CM-12	Femelle
	CM-13	Femelle
	CM-14	Mâle
	CM-15	Mâle
	CM-16	Mâle
	CM-17	Mâle
	CM-18	Femelle
	CM-19	Femelle
	CM-20	Mâle
	CM-21	Mâle
	CM-22	Femelle
	CM-23	Femelle
	CM-24	Femelle
	CM-25	Mâle
	CM-26	Mâle
	CM-27	Mâle
	CM-28	Femelle
	CM-29	Mâle
	CM-30	Femelle
	CM-31	Femelle
	CM-32	Femelle
Etude 7 2009 n=30	CM-33	Mâle
	CM-34	Mâle
	CM-35	Mâle
	CM-36	Femelle
	CM-37	Femelle
	CM-38	Femelle
	CM-39	Femelle
	CM-40	Mâle
	CM-41	Mâle

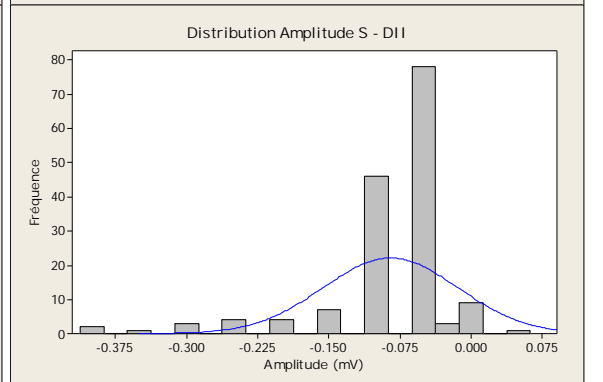
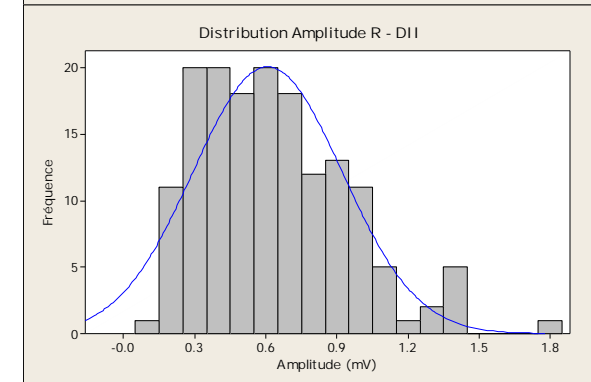
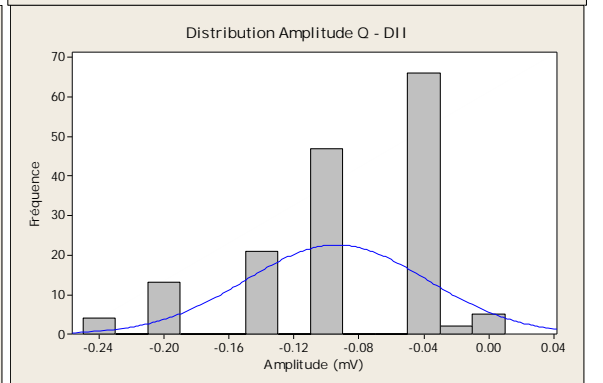
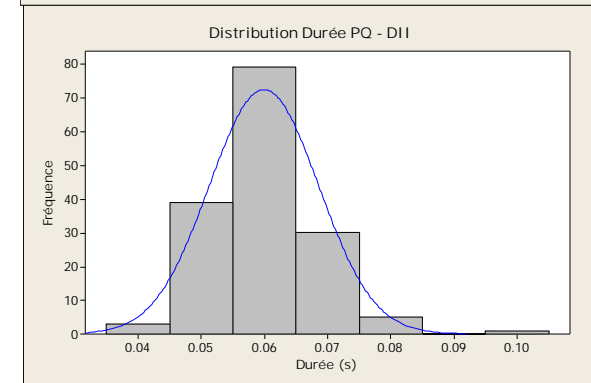
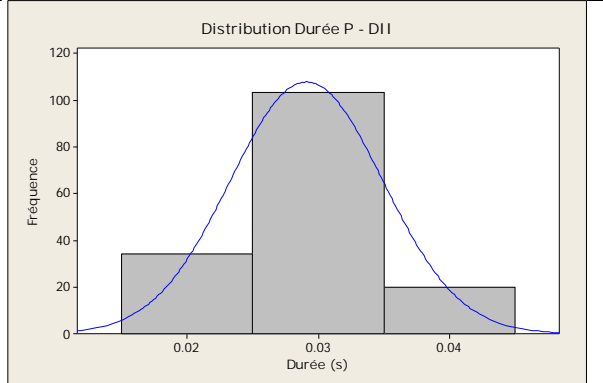
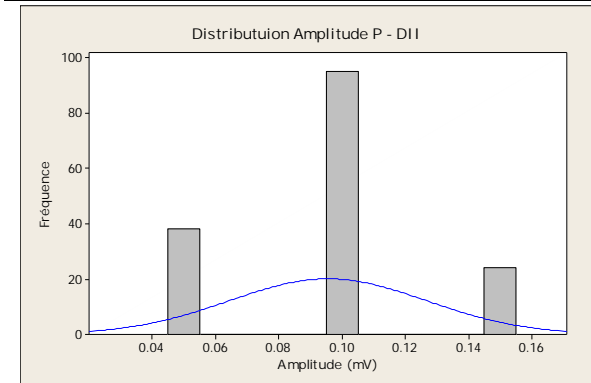
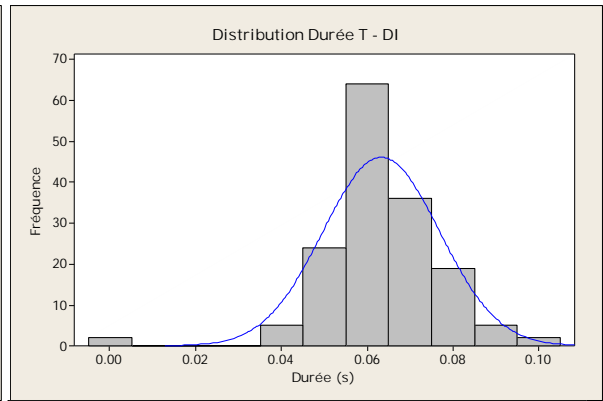
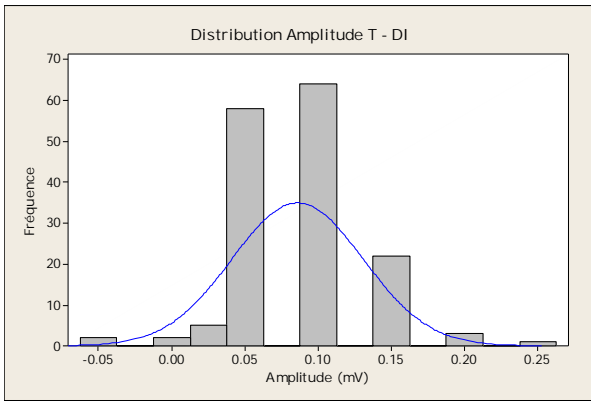
	CM-42	Mâle
	CM-43	Femelle
	CM-44	Femelle
	CM-45	Femelle
	CM-46	Femelle
	CM-47	Femelle
	CM-48	Mâle
	CM-49	Mâle
	CM-50	Mâle
	CM-51	Femelle
	CM-52	Femelle
	CM-53	Femelle
	CM-54	Mâle
	CM-55	Mâle
	CM-56	Mâle
	CM-57	Mâle
	CM-58	Mâle
	CM-59	Mâle
	CM-60	Femelle
	CM-61	Femelle
	CM-62	Femelle
Etude 8 2009 n=12	CM-63	Mâle
	CM-64	Mâle
	CM-65	Femelle
	CM-66	Mâle
	CM-67	Mâle
	CM-68	Femelle
	CM-69	Femelle
	CM-70	Mâle
	CM-71	Mâle
	CM-72	Femelle
	CM-73	Femelle
	CM-74	Femelle
Etude 9 2009 n=32	CM-75	Mâle
	CM-76	Mâle
	CM-77	Mâle
	CM-78	Mâle
	CM-79	Femelle
	CM-80	Femelle
	CM-81	Femelle
	CM-82	Femelle
	CM-83	Mâle
	CM-84	Mâle
	CM-85	Mâle
	CM-86	Mâle

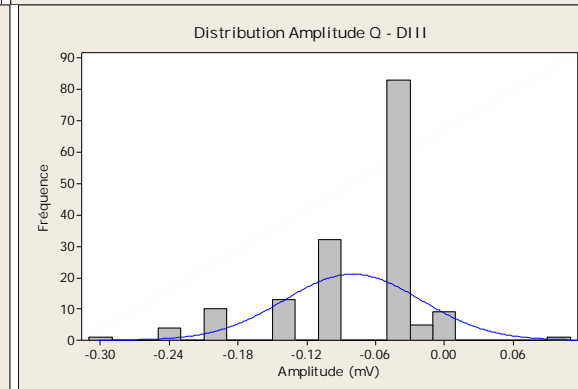
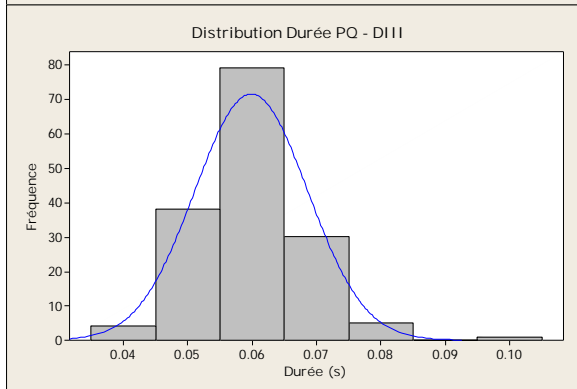
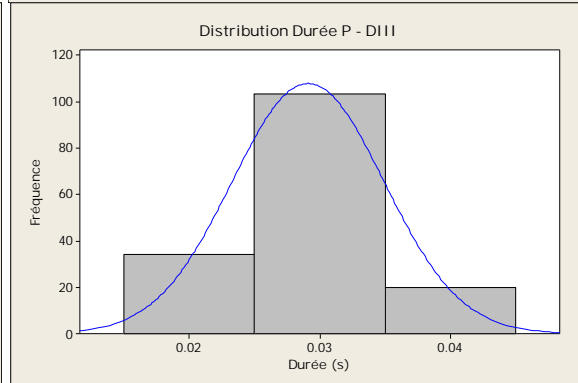
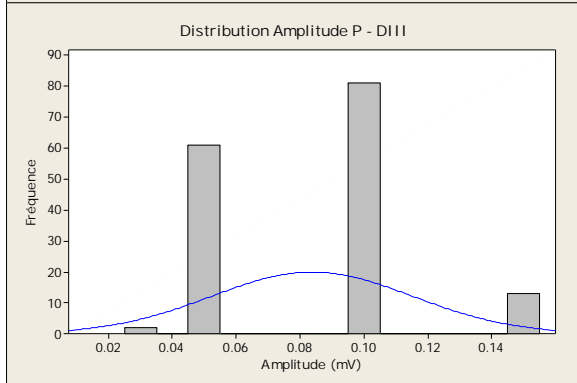
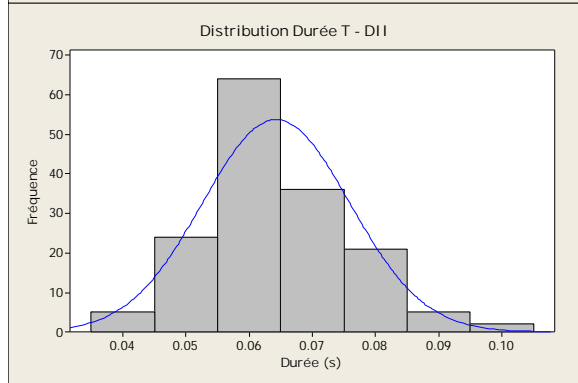
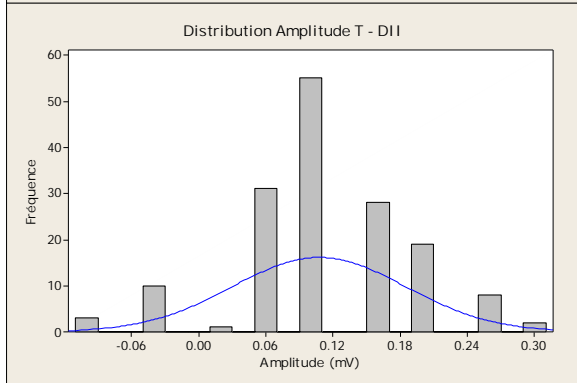
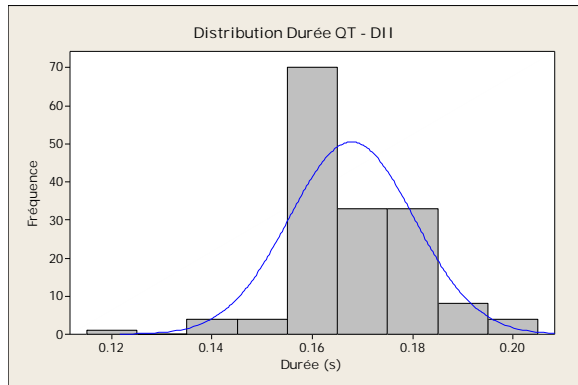
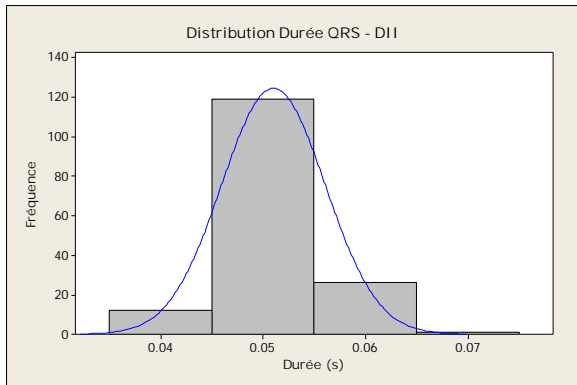
	CM-87	Femelle
	CM-88	Femelle
	CM-89	Femelle
	CM-90	Femelle
	CM-91	Mâle
	CM-92	Mâle
	CM-93	Mâle
	CM-94	Mâle
	CM-95	Femelle
	CM-96	Femelle
	CM-97	Femelle
	CM-98	Femelle
	CM-99	Mâle
	CM-100	Mâle
	CM-101	Mâle
	CM-102	Femelle
	CM-103	Femelle
	CM-104	Femelle
	CM-105	Femelle
	CM-106	Femelle
Etude 11 2010 n=34	CM-107	Femelle
	CM-108	Femelle
	CM-109	Mâle
	CM-110	Mâle
	CM-111	Mâle
	CM-112	Femelle
	CM-113	Femelle
	CM-114	Femelle
	CM-115	Femelle
	CM-116	Mâle
	CM-117	Mâle
	CM-118	Mâle
	CM-119	Mâle
	CM-120	Mâle
	CM-121	Mâle
CM-122	Femelle	
CM-123	Femelle	
CM-124	Femelle	
CM-125	Mâle	
CM-126	Mâle	
CM-127	Mâle	
CM-128	Femelle	
CM-129	Femelle	
CM-130	Femelle	
CM-131	Mâle	

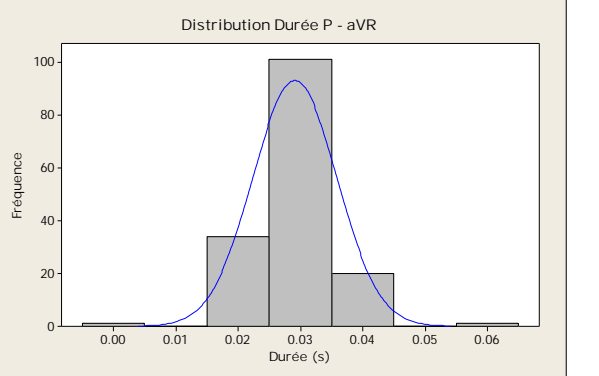
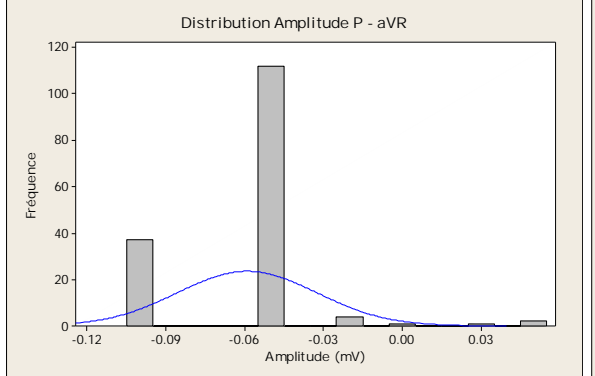
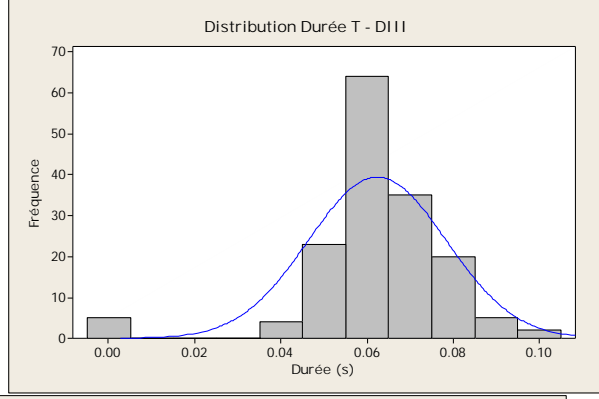
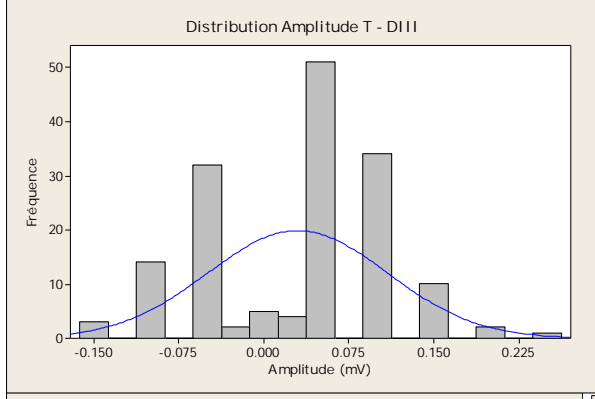
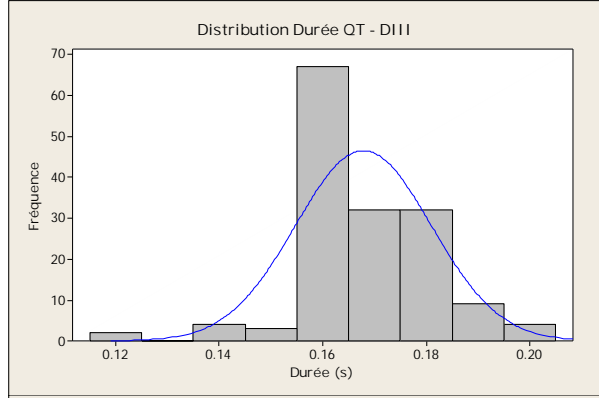
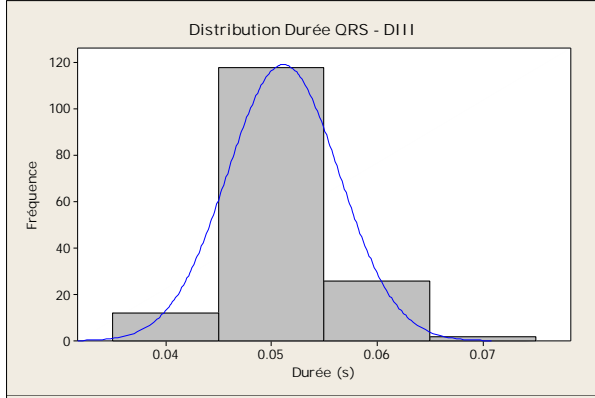
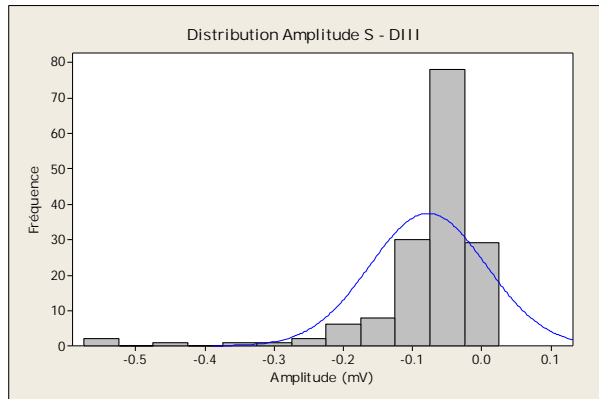
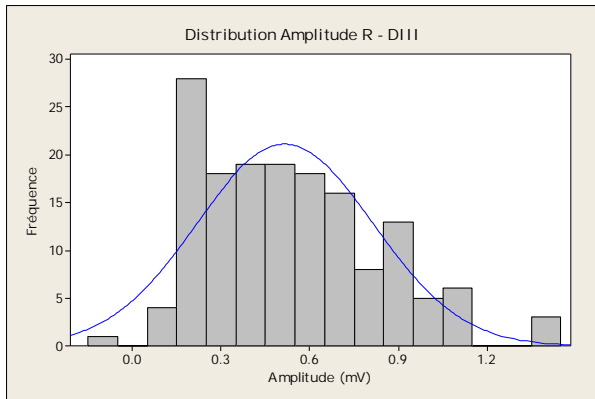
	CM-132	Mâle
	CM-133	Mâle
	CM-134	Femelle
	CM-135	Femelle
	CM-136	Femelle
	CM-137	Mâle
	CM-138	Mâle
	CM-139	Mâle
	CM-140	Mâle
Etude 10 2010 n=24	CM-141	Mâle
	CM-142	Mâle
	CM-143	Mâle
	CM-144	Femelle
	CM-145	Femelle
	CM-146	Femelle
	CM-147	Mâle
	CM-148	Mâle
	CM-149	Mâle
	CM-150	Femelle
	CM-151	Femelle
	CM-152	Femelle
	CM-153	Mâle
	CM-154	Mâle
	CM-155	Mâle
	CM-156	Femelle
	CM-157	Femelle
	CM-158	Femelle
	CM-159	Mâle
	CM-160	Mâle
	CM-161	Femelle
	CM-162	Femelle
	CM-163	Femelle
	CM-164	Mâle

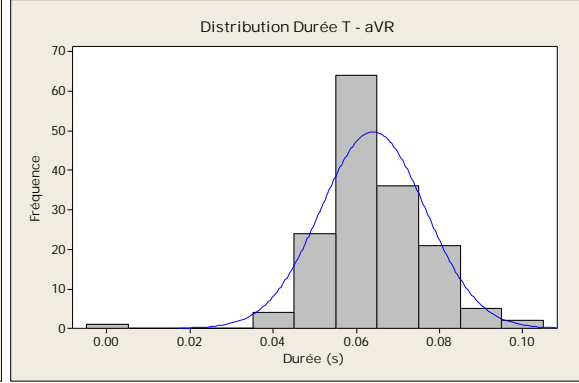
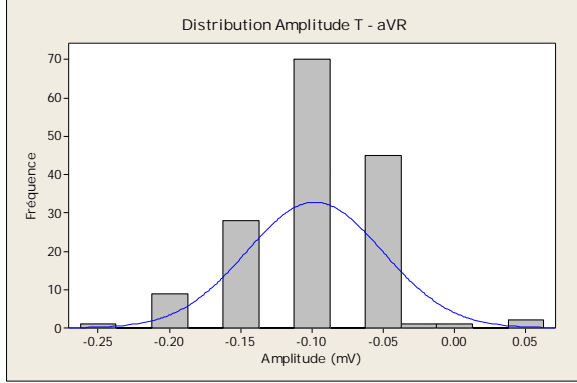
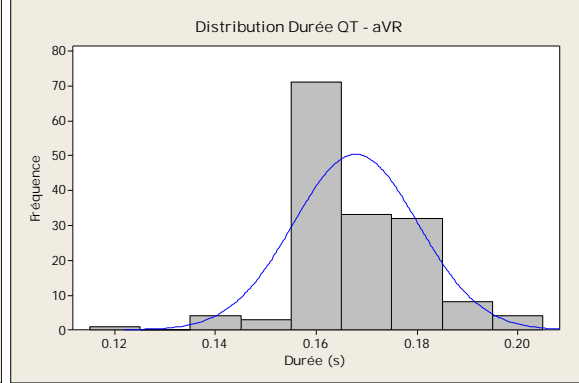
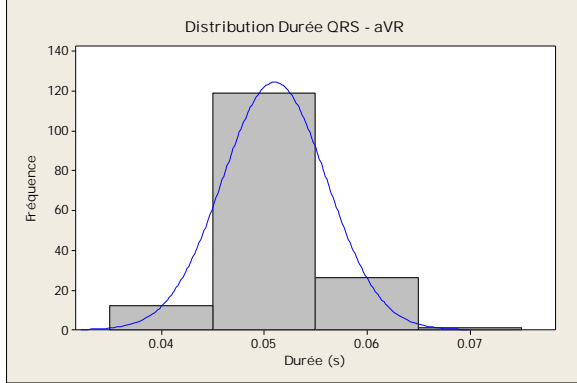
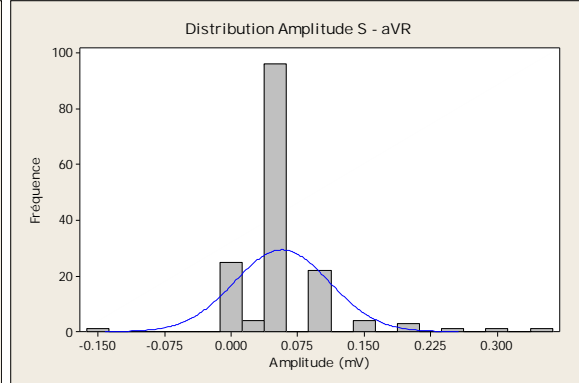
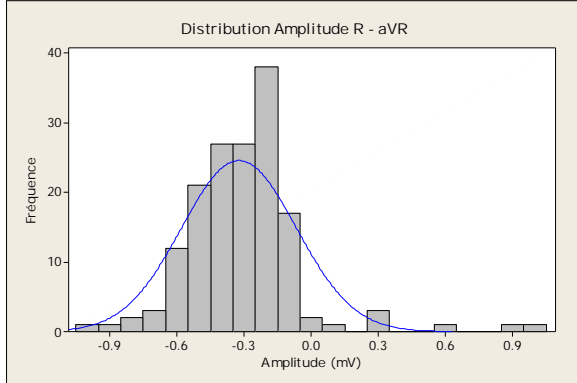
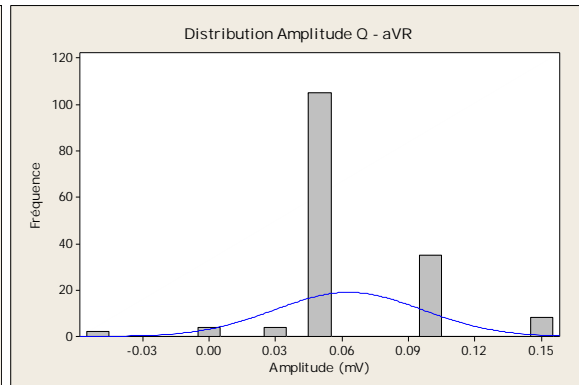
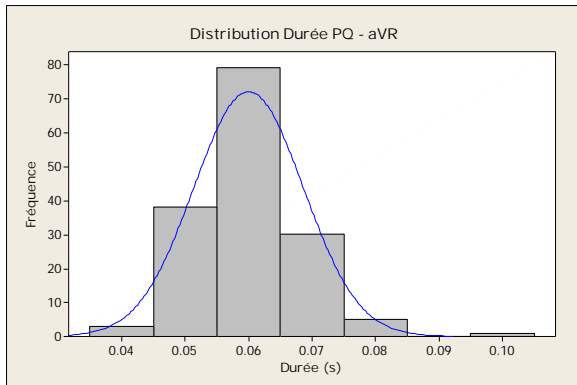
Annexe 4 : Distributions des paramètres de l'ECG du Cynomolgus en dérivation DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF

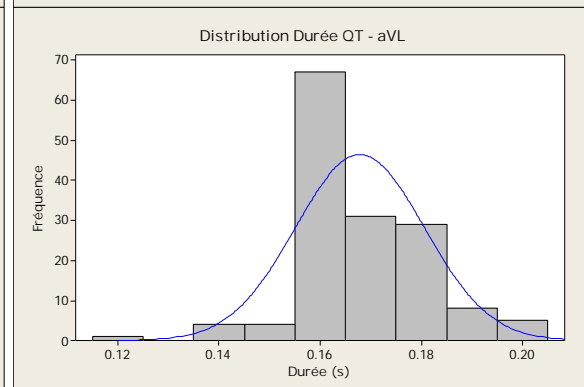
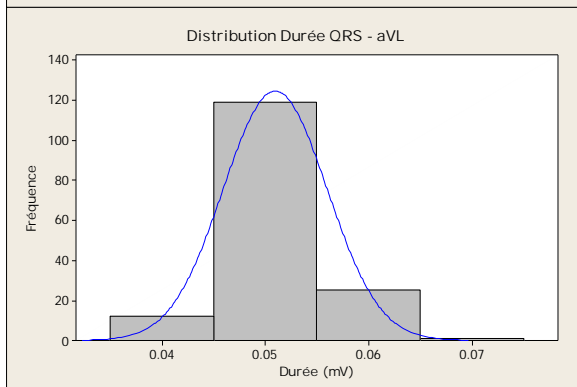
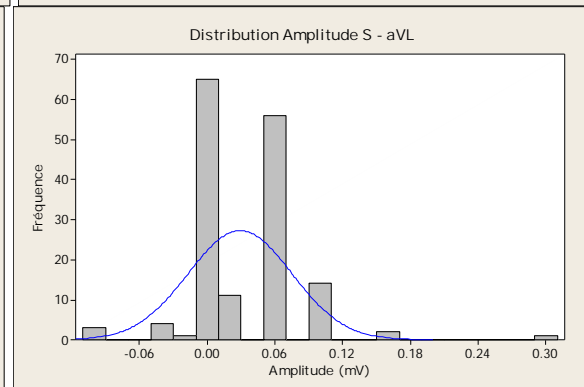
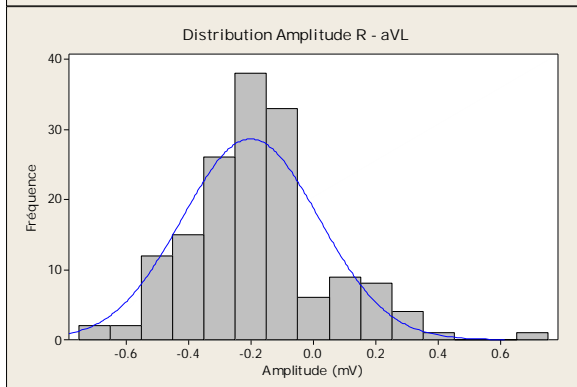
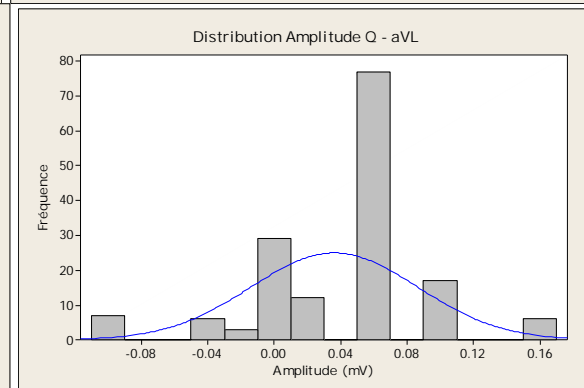
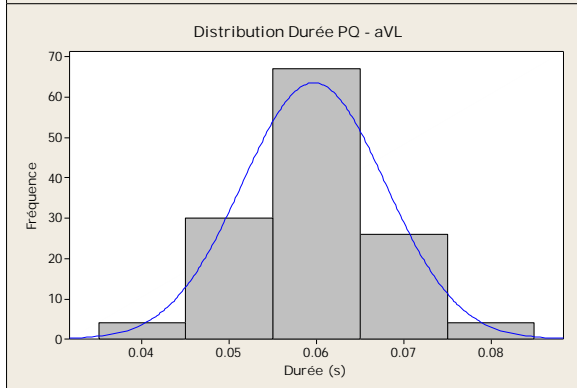
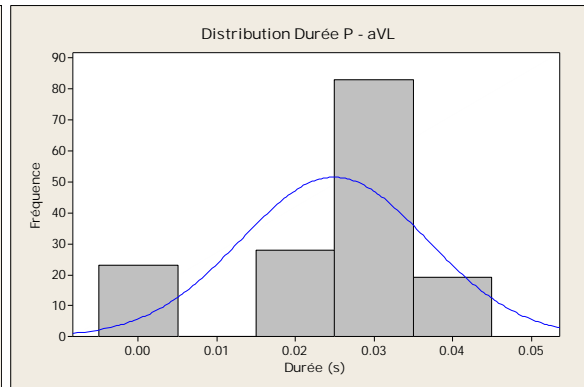
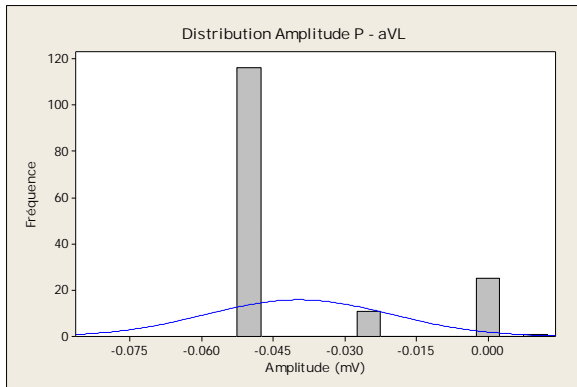


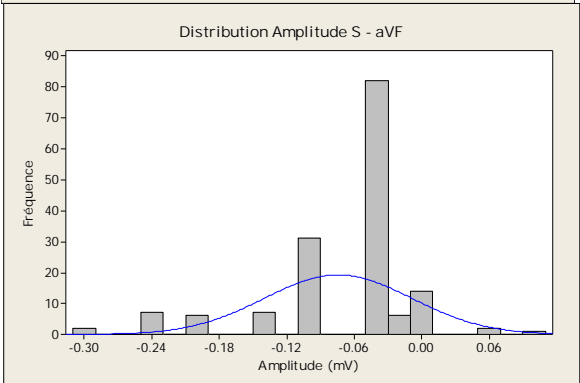
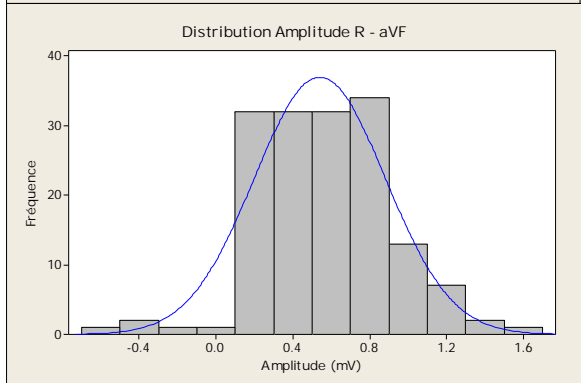
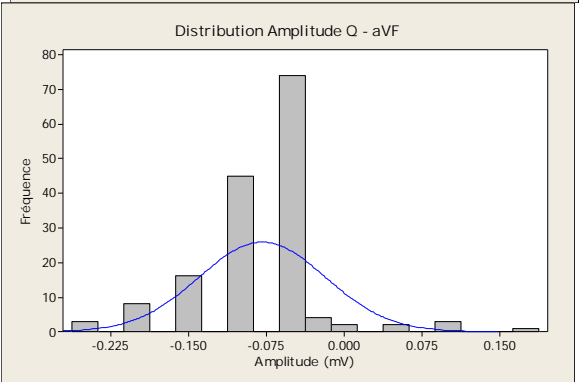
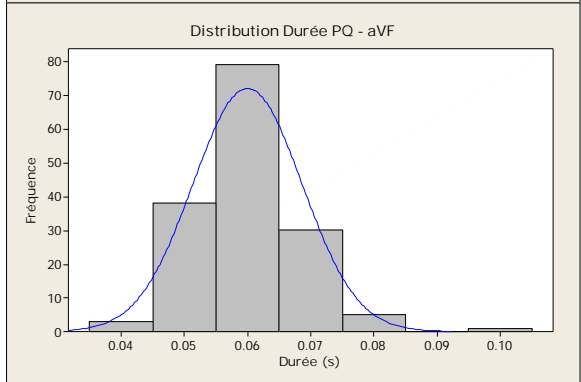
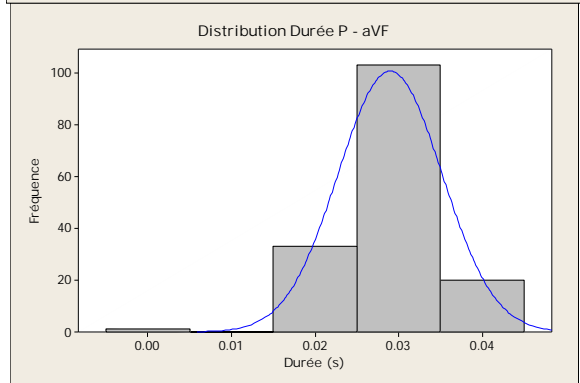
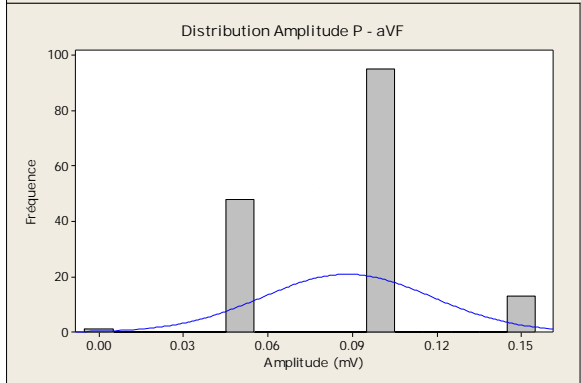
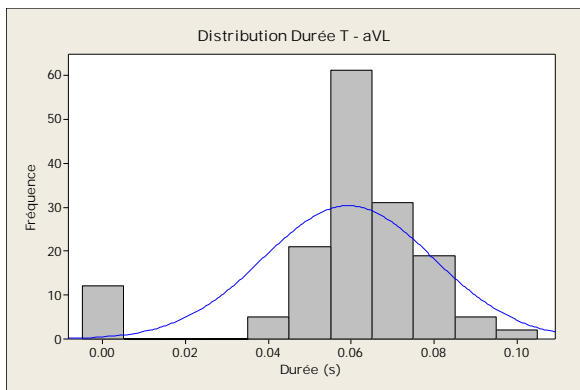
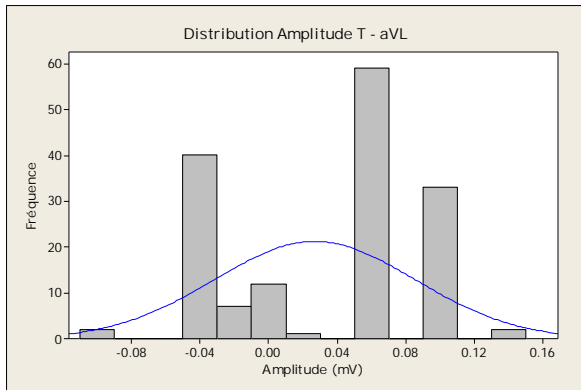


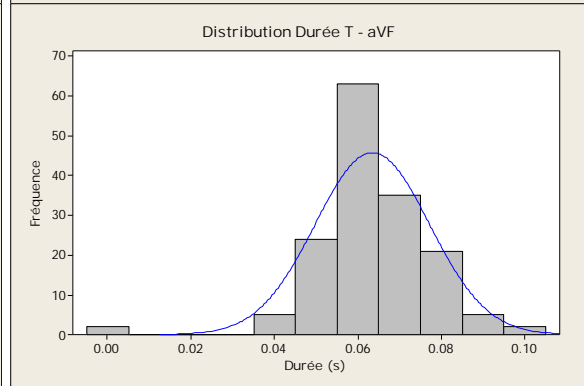
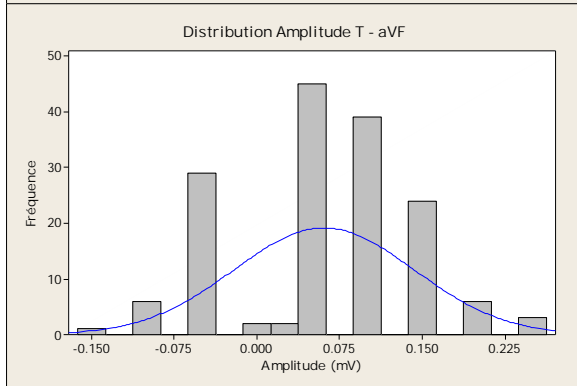
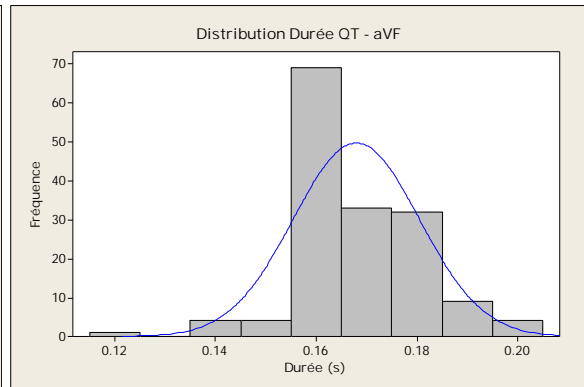
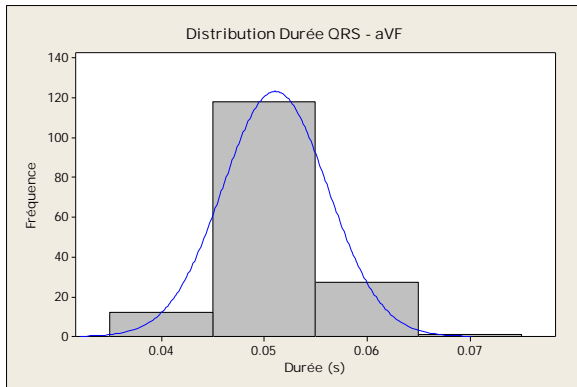












Toulouse, 2013

NOM : JOUSSERAND

PRENOM : Nicolas

TITRE : ÉTABLISSEMENT DES VALEURS DE RÉFÉRENCE DE L'ELECTROCARDIOGRAMME DU SINGE CYNOMOLGUS (*MACACA FASCICULARIS*) PROVENANT DE L'ILE MAURICE

RÉSUMÉ: *Macaca fascicularis* est un primate non humain fréquemment utilisé en expérimentation animale comme modèle de toxicologie cardiaque. L'utilisation de l'ECG comme indicateur de répercussion cardiovasculaire d'un principe actif est très répandue.

Le but de ce travail a été de déterminer des valeurs de référence de l'ECG de singes Cynomolgus vigiles provenant de l'île Maurice *a posteriori* pour les dérivations DI, DII, DIII, aVR, aVL et aVF, ainsi que l'axe cardiaque. Un effectif de 164 animaux sains (aucune anomalie clinique ou biologique) a participé à cette étude.

Les intervalles de référence ont été déterminés selon une méthode non-paramétrique à l'aide du logiciel Reference Value Advisor. L'effet sexe a été étudié.

MOTS-CLÉS: *Macaca fascicularis*, singe, Cynomolgus, ECG, électrocardiogramme, valeur référence, intervalle de référence, axe cardiaque

TITLE : ELECTROCARDIOGRAM REFERENCE INTERVALS IN CYNOMOLGUS MONKEYS (*MACACA FASCICULARIS*) FROM MAURITIUS

ABSTRACT : *Macaca fascicularis* is a non-human primate commonly used in animal experimentation as cardiac toxicology model. Using ECG as cardiovascular indicator of a drug is widespread.

The goal of this work was to determine reference values of non-sedated Cynomolgus ECG from Mauritius. A population of 164 sound animals (no abnormality on physical and biological examination) took part in this study.

Reference intervals were calculated with non-parametric method using Reference Value Advisor freeware. The effect of sex was identified.

KEYWORDS : *Macaca fascicularis*, monkey, Cynomolgus, ECG, electrocardiogram, reference value, reference interval, cardiac axis