

UNIVERSITÉ PARIS EST

Année 2010

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS EST

Spécialité : École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement

Par

SAGE Édouard

Le 16 Décembre 2010

**Hypertension pulmonaire post-embolique :
Remodelage vasculaire et ischémie chronique.**

Directeur de thèse : Pr Elie FADEL

JURY

M. le Pr Philippe DARTEVELLE
M. le Pr Alain CHAPELIER
M. le Pr Philippe DEVILLIER
M. le Pr Marc HUMBERT
M. le Dr Philippe HERVÉ
Mme le Dr Saadia EDDAHIBI
M. le Pr Elie FADEL

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Philippe DARTEVELLE

Votre savoir, votre expérience et votre talent font de vous un exemple. Vous me faites l'honneur de présider cette thèse, soyez assuré de mon plus profond respect et de mon admiration.

Monsieur le Professeur Elie FADEL

Ton niveau clinique et scientifique fait que tu es pour moi l'exemple même du chirurgien accompli. Tu as toujours su me guider avec enthousiasme, dynamisme et bonne humeur. Je pense pouvoir dire Elie, que tu es mon Mentor!

Monsieur le Professeur Alain CHAPELIER

Travailler à vos côtés me grandit un peu plus chaque jour. La confiance que vous portez en moi m'honore. Recevez toute mon estime, mon profond respect et toute mon admiration.

Monsieur le Professeur Marc HUMBERT

A chaque étape importante de ma carrière clinique et scientifique tu me fais l'honneur d'être présent. Reçois Marc toute ma gratitude et mon profond respect.

Madame le Docteur Saadia EDDAHIBI

Ta disponibilité et tes précieux conseils ont permis de faire aboutir ce travail. Tu me fais l'honneur de juger cette thèse ; reçois Saadia tous mes remerciements.

Monsieur le Docteur Philippe HERVÉ

Tes connaissances des maladies vasculaires pulmonaires tant sur le plan clinique que scientifique m'ont été indispensables. Tu me fais l'honneur de juger cette thèse ; reçois toute ma gratitude et mon profond respect.

Monsieur le Professeur Philippe DEVILLIER

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je vous en remercie.

Monsieur le Docteur Olaf MERCIER

Sans toi ce travail n'aurait jamais abouti. Reçois Olaf toute mon amitié.

Monsieur Benoit DECANTE

Tu es indissociable de ce parcours scientifique. Ton aide autant que ton amitié ont été indispensables à l'aboutissement de ce travail. Reçois Benoit toute mon amitié.

Messieurs les Docteurs Philippe PUYO et Pierre BONNETTE

Vous avez toléré mes absences hebdomadaires qui m'ont permis de faire aboutir ce travail. Votre soutien a été indispensable. Recevez Philippe et Pierre tous mes remerciements et mon amitié.

Je tiens à remercier pour leur aide précieuse :

- l'ensemble de l'équipe du laboratoire de chirurgie expérimentale
- Tous les membres de l'unité INSERM U999.

Laure tu es le pilier de ma vie, sans ton soutien au quotidien ce travail n'aurait pu être. Je te remercie infiniment.

À mes 2 amours Florentin et Clément

À mes Parents dont le soutien logistique au quotidien me permet de m'épanouir dans ma passion.

À mes Beaux-Parents

À mon Frère

À ma Grand-Mère

À ma Famille...

À mes Amis...

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

HTP-PE	Hypertension pulmonaire post-embolique
RPT	Résistance pulmonaire totale
TEP	Thrombo-endarterectomie pulmonaire
PAPm	Pression artérielle pulmonaire moyenne
PCP	Pression capillaire pulmonaire
MTE	Maladie thrombo-embolique
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
IGF	Insulin Growth Factor
TGF-β	Transforming Growth Factor
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein 1
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
t-PA	Tissular Plasminogen Activator
BMPR2	Bone Morphogenic Protein Receptor 2
ET-1	Endothéline-1
ETA	Récepteur A de l'endothéline-1
ETB	Récepteur B de l'endothéline-1
5-HT	Sérotonine
Ang-1	Angiopoïétine-1
Tie2	Récepteur des Angiopoïétines
NOSe	NO synthase endothéliale
NOSi	NO synthase inductible
HTP	Hypertension artérielle pulmonaire
CE	Cellule endothéliale
CML	Cellule musculaire lisse
Kv	Canal potassique voltage dépendant
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen

RÉSUMÉ

L'hypertension pulmonaire post-embolique (HTPPE) est une maladie rare liée à la persistance et à l'organisation fibreuse de caillots au sein du lit vasculaire pulmonaire après une ou plusieurs embolies pulmonaires aiguës. Il en résulte une augmentation des résistances pulmonaires totales (RPT) aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. Le traitement curatif de cette maladie, la thrombo-endarterectomie pulmonaire, présente une mortalité post-opératoire d'environ 5%. Cette mortalité est directement liée à deux complications : l'œdème pulmonaire de reperfusion et la persistance de RPT élevées. Si l'œdème est prévisible en cas d'obstruction majeure et proximale, c'est la discordance entre des pressions anormalement élevées et l'importance de l'obstruction qui est prédictive de la persistance de RPT élevées. Cette inadéquation témoigne d'un remodelage vasculaire pulmonaire dans les territoires non obstrués identique à celui rencontré dans l'hypertension pulmonaire idiopathique. Cette hypothèse du double compartiment vasculaire n'a jamais été prouvée, mais semble être la clé physiopathologique de la maladie.

Nous avons débuté par l'étude de la physiopathologie de l'œdème pulmonaire de reperfusion en utilisant un modèle porcin d'ischémie chronique/reperfusion pulmonaire. Nous avons ainsi démontré que l'ischémie chronique augmente l'expression de certains gènes pro-apoptotiques (Thombospondin-1 et PAI-1), provoquant au moment de la reperfusion une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales pulmonaires. Nous avons montré que l'apoptose des cellules endothéliales était corrélée à la dysfonction endothéliale. Nous avons de plus montré que l'adjonction d'une molécule anti-apoptotique (Pentoxifylline) diminuait le taux de cellules endothéliales apoptotiques et dans le même temps corrigeait partiellement la dysfonction endothéliale. Nous avons ensuite développé un modèle d'hyperdébit pulmonaire chez le cochon afin de modéliser le compartiment vasculaire pulmonaire non obstrué soumis à une redistribution du débit cardiaque. Nous avons démontré que l'hyperdébit pulmonaire provoquait des lésions microvasculaires pulmonaires à type d'épaississement de la média du même type que celles observées dans l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique. Nous avons montré le rôle clef de l'Endothéline-1 (ET-1) et de l'Angiopoiétine-1 dans la formation de ces lésions. Ces mêmes lésions microvasculaires régresaient progressivement après l'arrêt de l'hyperdébit pulmonaire pouvant expliquer la poursuite de l'amélioration des données hémodynamiques des patients opérés à distance de l'intervention. L'inhibition de ET-1 a permis d'accélérer la régression de la vasculopathie par hyperdébit soulignant l'intérêt de ET-1 comme cible thérapeutique chez les patients ayant une vasculopathie pulmonaire distale prédominante. Et enfin nous avons démontré pour la première fois le rôle direct de l'ischémie chronique dans le développement des lésions de remodelage vasculaire des territoires non obstrués.

Au même titre que l'on ne peut pas résumer la maladie à une simple obstruction vasculaire, le remodelage vasculaire pulmonaire ne peut expliquer à lui seul la physiopathologie de la maladie. Il est maintenant clair que l'ischémie chronique induite par l'obstruction vasculaire induit au moins une partie des lésions de remodelage dans les territoires libres. Il reste maintenant à identifier les signaux ischémiques afin d'envisager des traitements ciblés.

INTRODUCTION	8
DÉFINITION	12
ÉPIDÉMIOLOGIE	14
ÉTIOLOGIE	15
PHYSIOPATHOLOGIE	16
A. OBSTRUCTION VASCULAIRE	17
1. Coagulation et fibrinolyse	17
2. Fibrinogène	19
3. Vasculopathie post-obstructive	19
a. Hyper-vascularisation bronchique de suppléance.	19
b. Lésions vasculaires post-obstructives	20
c. Lésions de reperfusion.....	20
B. REMODELAGE VASCULAIRE	21
1. Dysfonction des éléments de la paroi vasculaire	21
a. Dysfonction de la cellule endothéliale	22
b. Dysfonction de la cellule musculaire lisse.....	24
c. Dysfonction de la matrice extracellulaire	25
2. Angiogénèse	26
a. VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	26
b. PDGF (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>).....	26
c. Angiopoïétine (Ang-1).....	26
3. Inflammation	27
C. CONCLUSION	27
HYPOTHÈSES	28
PREMIÈRE ÉTUDE	30
1. Résultats	31
a. Apoptose de la cellule endothéliale.....	31
b. La fonction endothéliale	32
c. Expression des gènes VEGF, β FGF, Thps-1 et PAI-1 dans le tissu pulmonaire après	
ischémie chronique et reperfusion :.....	32
d. Effet de la Pentoxifylline sur l'apoptose.....	32
e. Effet de la pentoxifylline sur la fonction endothéliale.....	32
2. Conclusion	32
DEUXIÈME ÉTUDE	44
1. Résultats	45
a. Hémodynamique	45
b. Morphométrie	45
c. Vaso-réactivité des anneaux d'artère pulmonaire.....	46
d. Expression des gènes des voies ET-1, NOS et Angiopoïétine au sein du parenchyme	
pulmonaire.....	46
e. Expression des protéines des voies ET-1, NOS et Angiopoïétine au sein du parenchyme	
pulmonaire.....	47
f. Étude de l'activité de la Phosphodiesterase 5 (PDE5)	47
2. Conclusion	47
TROISIÈME ÉTUDE	57

1. Résultats	58
a. Hémodynamique	58
b. Remodelage vasculaire pulmonaire	58
c. Expression des gènes des voies ET-1 et Angiopoïétine au sein du parenchyme pulmonaire.....	59
2. Conclusion	59
QUATRIÈME ÉTUDE	67
1. Matériel et méthode	69
a. Modèle animal	69
b. Hémodynamique.....	69
c. Étude morphométrique de l'épaississement de la média des artérioles pulmonaires...	70
d. Étude de la vaso-réactivité pulmonaire in vitro	70
e. Étude de l'expression génique des facteurs de croissance : VEGF, PDGF, Insuline growth factor (IGF) au sein du parenchyme pulmonaire gauche.	70
f. Étude de l'expression des gènes des voies ET-1 et NOS : ET-1, ETA, ETB et NOS-e au sein du parenchyme pulmonaire gauche.....	70
2. Résultats	70
a. Hémodynamique	70
b. Étude morphométrique de l'épaississement de la média des artérioles pulmonaires. .	71
c. Étude de la vaso-réactivité pulmonaire in vitro.....	72
d. Expression des gènes des facteurs de croissance angiogéniques VEGF, PDGF et IGF dans le parenchyme pulmonaire gauche.....	73
e. Expression des gènes des voies ET-1 et NOS : ET-1, ETA, ETB et NOS-e au sein du parenchyme pulmonaire gauche.....	74
3. Conclusion	76
DISCUSSION	77
PERSPECTIVES	80
1. Étude sur le rôle du HIF dans le remodelage vasculaire.....	80
2. Étude de l'inhibition du remodelage vasculaire par le SORAFENIB et par l'IMATINIB	80
BIBLIOGRAPHIE	81

INTRODUCTION

L'hypertension pulmonaire post-embolique (HTPPE) est une pathologie rare et mortelle du fait d'une aggravation inéluctable de la symptomatologie. Cette pathologie est liée à la persistance et à l'organisation fibreuse de caillots au sein du lit vasculaire pulmonaire après une ou plusieurs embolies pulmonaires aiguës.

La conséquence de l'obstruction artérielle pulmonaire est une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires aboutissant à une insuffisance cardiaque droite.

La durée moyenne de survie est directement corrélée à la sévérité de l'hypertension pulmonaire (HTP) au moment du diagnostic initial (10% de survie à 5 ans si la pression artérielle pulmonaire (PAp) moyenne > 50 mmHg (1, 2)

L'incidence et la prévalence de cette maladie sont inconnues. Les données issues de cohortes historiques retrouvent un risque d'évolution vers l'HTPPE de 0,1 à 5,1% après une embolie pulmonaire aiguë (EP) (3-5). Ce risque élevé d'HTPPE après EP est sans doute encore sous-estimé puisque les auteurs ne prenaient en compte que les EP symptomatiques prises en charge en milieu médical. Or des séries autopsiques ont rapporté que le diagnostic d'embolie pulmonaire aiguë n'était suspecté que dans 70 à 80% des patients décédés d'EP (6, 7).

Aussi, la controverse persiste quant au seul rôle thrombo-embolique dans la genèse de l'HTPPE. En effet la non corrélation entre l'HTPPE et une anamnèse d'embolie pulmonaire (8), l'absence de facteur de risque thrombo-embolique (9) et la dissociation entre la gravité hémodynamique et le degré d'obstruction vasculaire (10) laissent imaginer une physiopathologie plus complexe qu'une simple obstruction mécanique.

Il est actuellement établi que l'obstruction artérielle pulmonaire par du matériel fibreux n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la genèse de l'HTPPE. En effet, l'obstruction chronique et irréversible du lit artériel pulmonaire entraîne une élévation des pressions pulmonaires qui s'accompagne d'un remodelage vasculaire. Ces phénomènes peuvent être à l'origine d'une véritable artériopathie secondaire des petits vaisseaux pulmonaires. Ainsi, l'obstruction artérielle proximale serait l'événement initial mais

l'aggravation de l'HTP résulterait du développement progressif d'un remodelage vasculaire dans les territoires non occlus (11). Cette hypothèse avait été émise pour la première fois par Moser et Braunwald en 1973 (12) qui avaient constaté que les artères pulmonaires de petit calibre situées dans les territoires non obstrués étaient le siège de lésions de remodelage similaires à celles rencontrées dans l'HTP idiopathique associant des lésions plexiformes et un remaniement hypertrophique de la paroi des artérioles pulmonaires (13, 14).

L'HTPPE aboutit donc à l'insuffisance cardiaque droite par augmentation des résistances pulmonaires totales (RPT) due à l'obstruction vasculaire proximale par du thrombus organisé et au remodelage vasculaire pulmonaire distal dans les zones non obstruées. Cette hypothèse du « double compartiment vasculaire pulmonaire » semble être la clé de la compréhension de la maladie.

Pour tenter d'élucider les mécanismes pathogéniques conduisant au développement d'une HTPPE, il est important de distinguer les facteurs susceptibles d'empêcher la reperméabilisation complète des artères pulmonaires de ceux qui sont impliqués dans le remodelage vasculaire. Les raisons pour lesquelles la résorption complète des caillots ne se produit pas chez certains patients, ne sont pas connues. Le lit artériel pulmonaire normal possède, en effet, un haut potentiel de fibrinolyse. Dans l'HTPPE, des altérations du système fibrinolytique pourraient exister mais elles n'ont cependant encore jamais été identifiées. De la même façon, les rôles des déficits en anticoagulants (déficits en antithrombine, protéine C, protéine S) et des mutations du facteur II et du facteur V dans la genèse de l'HTPPE, n'ont jamais été démontrés (9, 15). Seules deux thrombophilies ont démontré leur facteur favorisant dans l'évolution vers l'HTPPE : la présence d'anticorps anti-cardiolipine, observée chez 10 à 20% des malades (9) et l'augmentation du facteur VIII (16). La modification du fibrinogène semble aussi être une cause de résistance à la fibrinolyse du caillot (17).

Plusieurs autres facteurs de risque ont également été identifiés. Ils comprennent les pathologies inflammatoires chroniques, les syndromes myéloprolifératifs, la présence d'une dérivation ventriculo-atriale et la splénectomie (18). L'association entre ces différentes conditions et l'HTPPE suggèrent que des processus inflammatoires chroniques pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'HTPPE. Plusieurs études expérimentales confirment cette hypothèse et montrent que l'inflammation

pourrait causer un état pro-thrombotique et diminuer la résorption des thrombi (19, 20). Ainsi, des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1 (Macrophage Chemoattractant Protein-1) ont été retrouvés dans l'HTPPE et apparaissent corrélés à la sévérité de l'HTP (21).

Enfin, certains des mécanismes impliqués dans le remodelage vasculaire ont maintenant été identifiés. Il est actuellement admis, comme pour d'autres formes d'HTP, il pourrait exister une susceptibilité génétique favorisant le développement d'une HTPPE. Des mutations du gène BMPR-2 codant le récepteur du facteur morphogène de l'os de type II (BMPR-II) ont été décrites dans l'HTAP familiale et idiopathique (22-24). On sait maintenant que ces mutations BMPR-2 participent au remodelage vasculaire en favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses. Des mutations de ce type n'ont, toutefois, jamais été décrites dans l'HTPPE. Par contre, l'angiopoïétine-1 (Ang-1), molécule impliquée dans l'angiogenèse et la prolifération des cellules musculaires lisses, est surexprimée dans les poumons de patients porteurs d'une HTPPE (25).

L'angiopoïétine-1 bloque la transduction du signal par BMPR-2, même en l'absence de mutation germinale de BMPR-2 et pourrait ainsi entraîner une prolifération des cellules musculaires lisses. Cette altération d'une voie de signalisation semble jouer un rôle dans différentes formes d'HTAP incluant l'HTPPE (26). Enfin, tout comme dans d'autres formes d'HTAP, l'endothéline-1 (ET-1) contribue très probablement au remodelage vasculaire présent dans l'HTPPE (21, 26). En effet, il a été montré qu'il existe une élévation de l'ET-1 plasmatique chez les sujets atteints d'HTPPE (27, 28).

Les différents mécanismes moléculaires impliqués dans le remodelage vasculaire de l'HTPPE semblent être identiques, pour certains, à ceux observés dans l'HTP idiopathique. Cependant les remodelages vasculaires engendrés dans les territoires libres sont très difficilement prévisibles du fait d'une variation individuelle forte (29). Pourtant c'est l'association de cette vasculopathie à l'obstruction mécanique qui est responsable de la persistance de pressions pulmonaires élevées après thrombo-endarterectomie pulmonaire (TEP) (10, 30, 31). Les améliorations de la technique chirurgicale ainsi que les progrès de la réanimation post-opératoire ont permis de diminuer la mortalité péri-opératoire de 10% à moins de 5% en 15 ans au Centre Chirurgical Marie Lannelongue (32). Ainsi c'est la confrontation à l'échec thérapeutique

chez certains patients, malgré un geste chirurgical anatomiquement satisfaisant, qui a motivé l'ensemble de ce travail de recherche.

Notre démarche scientifique a été initialement d'essayer de comprendre la physiopathologie post-opératoire de la TEP sur un modèle porcin. Ce modèle mis au point précédemment nous a permis d'étudier la cellule endothéliale des artères pulmonaires en réponse à l'ischémie chronique et à la reperfusion.

Nous avons ensuite tenté de reproduire la vasculopathie pulmonaire distale d'hyperdébit des territoires non obstrués et d'en étudier les caractéristiques morphométriques, physiologiques et moléculaires. Nous avons exploré les mécanismes de sa régression à l'arrêt de l'hyperdébit afin de définir des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement spécifique de cette vasculopathie. Dans la suite de l'exploration des mécanismes d'hyperdébit, nous avons testé l'effet d'un antagoniste de l'endothéline-1 sur cette vasculopathie pulmonaire distale d'hyperdébit.

Et enfin nous avons essayé de comprendre les mécanismes physiopathologiques d'interaction angiogénique entre un territoire obstrué (en ischémie chronique) et un territoire libre afin de rechercher et comprendre le rôle que peut avoir le territoire pulmonaire ischémique (en aval de l'obstruction artérielle pulmonaire) sur le territoire pulmonaire non obstrué pour permettre de définir des cibles thérapeutiques potentielles pour la prise en charge spécifique de la vasculopathie.

DÉFINITION

L'HTPPE est définie comme une hypertension précapillaire avec des défauts vasculaires occlusifs dans les territoires des artères pulmonaires élastiques (lobaire, segmentaire et sous-segmentaire) (33). Elle doit répondre aux critères hémodynamiques suivant :

-Pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) \geq 25mmHg au repos.

-Pression capillaire pulmonaire (PCP) \leq 15 mmHG.

-Résistance pulmonaire $>$ 2 unités Wood.

L'HTPPE correspond au groupe 4 des étiologies d'hypertension pulmonaire dans la nouvelle classification de « Dana Point » datant de 2008 (34). Elle est ainsi reconnue comme une entité nosologique propre avec une physiopathologie, un diagnostic et un traitement particuliers.

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTP)

- 1.1. Idiopathique
- 1.2. Familiale
 - 1.2.1. Mutations *BMPR2*
 - 1.2.2. Mutations *ALK1*, *endogline* (avec ou sans maladie de Rendu-Osler)
 - 1.2.3. Mutations inconnues
- 1.3. Induites par médicaments ou toxiques
- 1.4. Associée à :
 - 1.4.1. Connectivites
 - 1.4.2. Infection par le VIH
 - 1.4.3. Hypertension portale
 - 1.4.4. Cardiopathies congénitales avec shunt
 - 1.4.5. Bilharziose
 - 1.4.6. Anémie hémolytique chronique
- 1.5. HTAP persistante des nouveaux-nés

1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire

2. Hypertension pulmonaire associée à une cardiopathie gauche

- 2.1. Dysfonction systolique
- 2.2. Dysfonction diastolique
- 2.3. Valvulopathies

3. Hypertension pulmonaire des maladies respiratoires et/ou hypoxémiques chroniques

- 3.1. Bronchopathie chronique obstructive
- 3.2. Maladies interstitielles chroniques
- 3.3. Autres maladies respiratoires restrictives et/ou obstructives
- 3.4. Pathologies du sommeil
- 3.5. Hypoventilation alvéolaire
- 3.6. Exposition chronique à l'altitude
- 3.7. Anomalies du développement

4. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique

5. HTP de mécanisme multifactoriel ou incertain

- 5.1. Maladies hématologiques : syndromes myéloprolifératifs, splénectomie.
- 5.2. Maladies systémiques : sarcoïdose, histiocytose, lymphangioloïomyomatose, neurofibromatose, vascularites.
- 5.3. Maladies métaboliques : glycogénoses, maladie de Gaucher, dysthyroïdies.
- 5.4. Autres : obstructions vasc. pulm. tumorales, médiastinites fibreuses, insuffisance rénale chronique en dialyse.

Tableau 1: Classification de l'hypertension pulmonaire (Dana Point 2008) (34).

ÉPIDÉMIOLOGIE

L'incidence et la prévalence exactes de cette maladie sont inconnues. Depuis quelques années un certains nombres de facteurs de risque propre à L'HTPPE ont été découverts. Ainsi les populations a risque de HTPPE sont :

- les patients splénectomisés (35-37),
- les patients porteurs d'un shunt Ventriculo-auriculaire pour le traitement d'une hydrocéphalie ou porteurs d'un pacemaker avec une anamnèse d'infection (36, 38),
- les patients atteints d'une maladie inflammatoire du tube digestif (18),
- les patients substitués en hormones thyroïdiennes (36),
- les patients en présence d'anticorps antiphospholipides circulants (9, 36),
- les patients atteints ou en rémission d'un cancer (36),
- les patients au groupe sanguin « non-O » (16),
- les patients présentant un taux élevé de facteur VIII (16)
- et enfin les patients porteurs du polymorphisme FGA Thr312Ala du fibrinogène (39).

L'ensemble de ces facteurs de risque sont issus d'analyses cas-témoin de patients présentant de l'HTPPE, aucune analyse prospective des populations à risque n'est disponible à ce jour.

ÉTIOLOGIE

L'HTPPE est la résultante d'une ou plusieurs embolies pulmonaires aiguës. L'origine précise de cette maladie est mal définie, mais l'hypothèse la plus couramment admise est une fibrinolyse incomplète du caillot, responsable d'une organisation fibreuse chronique de la lumière vasculaire des artères pulmonaires. Cette organisation fibreuse aboutit à une obstruction vasculaire suffisante pour provoquer une élévation de la PAPm associée à un remodelage vasculaire pulmonaire. Il en résulte une augmentation des résistances pulmonaires aboutissant à une insuffisance cardiaque droite et à la mort.

Il existe donc probablement deux mécanismes pathogéniques distincts responsables de l'évolution vers l'hypertension pulmonaire après une embolie pulmonaire aiguë :

- la fibrinolyse incomplète du caillot.

- le remodelage vasculaire.

PHYSIOPATHOLOGIE

Les premiers cas rapportés de chirurgie de ce que l'on appelait à l'époque l'embolie pulmonaire chronique datent de 1965 (40). A cette époque l'HTPPE était un mystère et sa physiopathologie totalement inconnue. Moser décrit l'intervention comme une embolectomie mais note déjà une différence par rapport au traitement chirurgical des embolies pulmonaires aiguës. En effet, il remarque que l'intervention est un succès quand il arrive à retirer un embolo fibreux, blanchâtre, moulant les branches artérielles pulmonaires laissant place à un reflux de sang rouge. Malgré les bonnes conclusions de cette publication, le traitement chirurgical de l'HTPPE a eu de mauvais résultats jusqu'à la fin des années 70 (41). En effet, ce n'est qu'à partir du début des années 80 que l'on a compris qu'il s'agissait d'une organisation fibreuse du caillot s'intégrant dans la paroi artérielle pulmonaire. Le terme de thrombo-endartériectomie pulmonaire a supplanté celui d'embolectomie. Entre 1980 et 1990, l'équipe de San Diego a réalisé plus de 100 endartériectomies pulmonaires sous circulation extracorporelle avec arrêt circulatoire avec une mortalité postopératoire de 13% (42) due majoritairement soit à un œdème pulmonaire soit à une hypertension pulmonaire persistante. A cette époque, il existait une bonne compréhension de l'obstruction vasculaire pulmonaire et la désobstruction ne posait plus de problème à partir du moment où les lésions étaient proximales.

Rapidement, la communauté médicale a constaté qu'elle ne pouvait plus réduire la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire post-embolique à la simple obstruction vasculaire. La première publication à mettre en cause les territoires vasculaires non obstrués date de 1972 (43) et sera confirmée par Moser en 1993 (14). Il s'agissait d'études anatomopathologiques de poumons de patients atteints d'HTPPE montrant l'existence de lésions vasculaires pulmonaires distales similaires à celles retrouvées dans l'HTP idiopathique. Ces lésions prédominaient dans les zones non obstruées. Ceci fut le premier pas vers la théorie physiopathologique du double compartiment vasculaire pulmonaire. En effet d'autres observations prouvent que l'augmentation des RPT dans l'HTPPE n'est pas seulement due à l'obstruction vasculaire pulmonaire. La première d'entre elles est l'existence d'une période dite « lune de miel » dans l'évolution naturelle de la maladie. En effet, il existe une période asymptomatique entre le premier épisode d'embolie pulmonaire et le début du retentissement cardiaque durant laquelle

les RPT augmentent sans nouvel épisode embolique. Alors qu'en cas d'embolie pulmonaire aiguë il existe une relation exponentielle entre les RPT et le pourcentage d'obstruction vasculaire, il n'existe aucune corrélation entre les RPT et l'obstruction vasculaire pulmonaire chronique déterminée par scintigraphie(44). A niveau d'obstruction égal, le patient atteint d'HTPPE a des RPT plus élevées témoignant d'une pathologie vasculaire associée à l'obstruction proximale.

Ainsi, bien que l'embolie pulmonaire et la non-résolution du caillot soient les événements initiaux de la maladie, le remodelage vasculaire pulmonaire est responsable d'une partie non négligeable de l'élévation des RPT.

A. OBSTRUCTION VASCULAIRE

1. Coagulation et fibrinolyse

Les raisons pour lesquelles la résorption complète des caillots ne se produit pas chez certains patients, ne sont pas connues. Le lit artériel pulmonaire normal possède, en effet, un haut potentiel de fibrinolyse. Dans l'HTPPE, des altérations du système fibrinolytique pourraient exister mais elles n'ont cependant encore jamais été identifiées. En effet, aucune mutation du facteur II ni du facteur V n'a été retrouvée dans les cohortes de malades étudiés. De même le rôle des déficits en antithrombine, en protéine C et en protéine S n'a jamais été démontré(9, 15).

Tous les efforts réalisés pour rechercher un déficit fonctionnel (45)ou un polymorphisme génomique (39) dans le système fibrinolytique vasculaire pulmonaire sont restés vains.

Même la sécrétion par les cellules endothéliales de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), principal activateur de la fibrinolyse, et d'un de ses inhibiteurs, le PAI-1 n'apparaît pas différente dans l'HTP-PE et dans une population témoin (45, 46).

Jusqu'à récemment, la seule thrombophilie dont on savait qu'elle pouvait favoriser l'évolution vers l'HTPPE était la présence d'anticorps anti-cardiolipine, observée chez 10 à 20% des malades (9). Bonderman et coll. (36) ont montré, depuis, que le facteur VIII

représentait également un facteur prothrombotique relié à l'HTPPE. En effet, il a été démontré dans cette étude qu'il existait des taux plasmatiques de facteur VIII significativement plus élevés dans l'HTPPE que dans l'HTP idiopathique ou dans un groupe contrôle.

Enfin, certains auteurs évoquent des mécanismes de thrombose « in situ » qui pourraient participer au développement et à l'aggravation de l'HTPPE(47). Ainsi différents facteurs de risques locaux ou généraux ont pu être identifiés :

- L'hypothyroïdie comme facteur propre(48), ou par l'intermédiaire de son traitement substitutif par le Levothyrox en augmentant le taux de facteur Willebrand (vWF) (49).

- Le cancer : les facteurs tissulaires des cellules cancéreuses ont une action procoagulante en activant le facteur X et le facteur VII. Il en résulte ainsi une thrombose plus ou moins locale(50).

- Les anticorps anti-phospholipides et anti-lupique. Leur implication dans l'HTPPE a été mise en évidence sans pour autant dévoiler leur rôle direct (9).

- L'infection de matériel étranger dans le territoire cave supérieur. Cette association a particulièrement été mise en évidence avec le Shunt Ventriculo-atrial et les Pace-Maker(18). Le germe le plus souvent responsable étant le Staphylocoque (Auréus ou Epidermidis) qui retarde la résolution du thrombus et active les molécules pro-fibrotiques (38).

- La splénectomie : la proportion de patients splénectomisés présentant une HTPPE est très importante entre 6 et 9% en fonction des études(35-37). Plusieurs équipes ont donc essayé de déterminer les mécanismes pathogéniques reliant ces deux conditions. Ainsi ont été évoqués : le potentiel pro-thrombotique d'érythrocytes anormaux, l'interaction entre les membranes d'érythrocytes circulants et le lit vasculaire pulmonaire et enfin l'activation plaquettaire anormale. (37, 51)

- Autres : Les maladies inflammatoires du tube digestif(18), les patients porteurs d'un groupe sanguin non-O(36).

2. Fibrinogène

Une des théories sur la résolution partielle du caillot, évoque une modification du fibrinogène qui serait responsable d'une résistance à la fibrinolyse. Ainsi une étude récente a mis en évidence un polymorphisme particulier du Fibrinogène dont la prévalence est augmentée dans l'HTPPE par rapport au groupe contrôle. En effet le génotype et l'allèle $A\alpha$ Thr312Ala du fibrinogène sont plus fréquemment retrouvés dans la maladie thromboembolique veineuse et l'HTPPE (17, 39).

D'autres mutations génétiques du fibrinogène ont été mises en évidence chez un petit nombre de patients présentant une HTPPE. Les mutations ont été retrouvée chez 5 des 33 patients de la cohorte présentant une HTPPE (52):

- Fibrinogène 1 : B β P235L/ γ R375W
- Fibrinogène 2 : B β P235L/ γ Y114H
- Fibrinogène 3 : B β P235L
- Fibrinogène 4 : $A\alpha$ L69H
- Fibrinogène 5 : $A\alpha$ R554H

Ces résultats suggèrent que des différences de structure moléculaire du fibrinogène semblent être impliquées dans la genèse de l'HTPPE.

3. Vasculopathie post-obstructive

La vasculopathie post-obstructive désigne les modifications de la circulation bronchique et le remodelage vasculaire pulmonaire qui apparaissent après ligature chronique d'une artère pulmonaire.

a. Hyper-vascularisation bronchique de suppléance.

C'est Virchow qui a montré pour la première fois au 19^{ème} siècle que la ligature d'une artère pulmonaire entraînait rarement un infarctus du poumon et que la circulation bronchique en s'hypertrophiant assurait sa suppléance vasculaire (53).

L'obstruction vasculaire a été modélisée par Elie Fadel dans le laboratoire sur un modèle porcin par la ligature de l'artère pulmonaire gauche(54-56). Après 5 semaines de

ligature, il existait une hyper-vascularisation bronchique majeure. Cette hypertrophie bronchique était responsable d'une augmentation du débit vasculaire bronchique par augmentation du nombre et du diamètre des artères bronchiques(56, 57). A ce jour, il n'a pas été démontré si il s'agissait d'une néo-angiogénèse ou d'un recrutement d'un réseau existant mais involué à l'état basal.

b. Lésions vasculaires post-obstructives

Les travaux de René Michel ont montré que les résistances vasculaires pulmonaires étaient trois fois plus élevées dans le poumon lié par rapport au poumon non lié controlatéral (58). Par ailleurs, des lésions histologiques en aval de la ligature pulmonaire à type d'épaississement de la média, de réduction du diamètre des artères pulmonaires, de musculation des artérioles pulmonaires distales et de zone de prolifération intinale, ont été retrouvées (59). Le mécanisme de cette vasculopathie post-obstructive serait lié en partie à l'hypoxie induite par la ligature mais aussi la sécrétion de facteurs pro-angiogénique (58). Aucune preuve de ces théories n'a été donnée, si ce n'est la similitude anatomo-pathologique avec la vasculopathie retrouvée dans l'hypertension pulmonaire hypoxique (60).

c. Lésions de reperfusion

L'étude menée par Elie Fadel (55) a mis en évidence chez le porc que l'œdème était lié à la reperfusion. En fait, il a montré que les résistances artérielles pulmonaires, ainsi que le coefficient de filtration (index de perméabilité endothéliale au fluide) étaient augmentés après reperfusion dans le groupe ischémie chronique par rapport au groupe témoin. L'étude de Fischer (61) concernant l'ischémie-reperfusion aiguë a montré chez le rat une relation directe entre le temps d'ischémie et le type de mort cellulaire. Il a observé que le pourcentage de cellules apoptotiques et nécrotiques varie au cours de l'expérience entre 0 et 24 heures d'ischémie. Le taux de cellules apoptotiques est supérieur à celui de cellules nécrotiques en début d'expérience et ce rapport s'inverse après 12 heures. La conclusion de cette étude était que plus le taux de cellules nécrotiques était important avant la reperfusion, plus le taux de complication après reperfusion était élevé. Cependant le poumon est un organe à deux réseaux artériels distincts : la circulation pulmonaire et la circulation bronchique. Dans les conditions normales, c'est la circulation pulmonaire qui assure la quasi-totalité de l'apport sanguin

au parenchyme pulmonaire. Par contre dans des conditions d'ischémie chronique, l'obstruction de la circulation pulmonaire entraîne un développement de la circulation bronchique pouvant atteindre 25% du débit cardiaque global (62, 63).

Il a été montré que d'un point de vue macroscopique les lésions d'ischémie chronique étaient moins graves que les lésions aiguës et ce grâce à l'expansion du réseau de la circulation bronchique qui peut suppléer le réseau pulmonaire, évitant ainsi la nécrose pulmonaire. En effet Elie Fadel (54) a démontré dans ses études sur le porc que l'ischémie chronique par ligature de l'artère pulmonaire gauche provoque une altération de la relaxation de l'endothélium par l'intermédiaire d'une diminution du taux et de l'activité de la NO Synthase endothéliale (NOS-e) et une augmentation des résistances artérielles pulmonaires. Il a mis d'autre part en évidence qu'il existe une récupération du métabolisme énergétique, illustrée par la diminution du taux de lactates et l'augmentation du taux d'ATP, dans l'ischémie chronique par rapport à l'ischémie aiguë et ce grâce au développement du réseau artérielle bronchique. Dans une autre étude il a démontré que la fonction endothéliale était altérée lors de la reperfusion aiguë de l'ischémie chronique (55).

B. REMODELAGE VASCULAIRE

La première observation de l'existence de lésions vasculaires pulmonaires dans les territoires non obstrués date de 1972(64). Il a fallu attendre 1993 pour que la théorie d'une simple obstruction vasculaire soit remise en cause (14). Cette remise en cause a fait suite à une étude anatomopathologique de poumons de patients atteints d'HTPPE mettant en évidence l'existence de lésions vasculaires pulmonaires distales similaires à celles rencontrées dans l'HTP primitive(14).

1. Dysfonction des éléments de la paroi vasculaire

Les lésions vasculaires induites lors de l'HTPPE ont été décrites comme intéressant la cellule endothéliale, la cellule musculaire lisse et le fibroblaste(45).

a. Dysfonction de la cellule endothéliale

i. Le NO et la NOSynthase

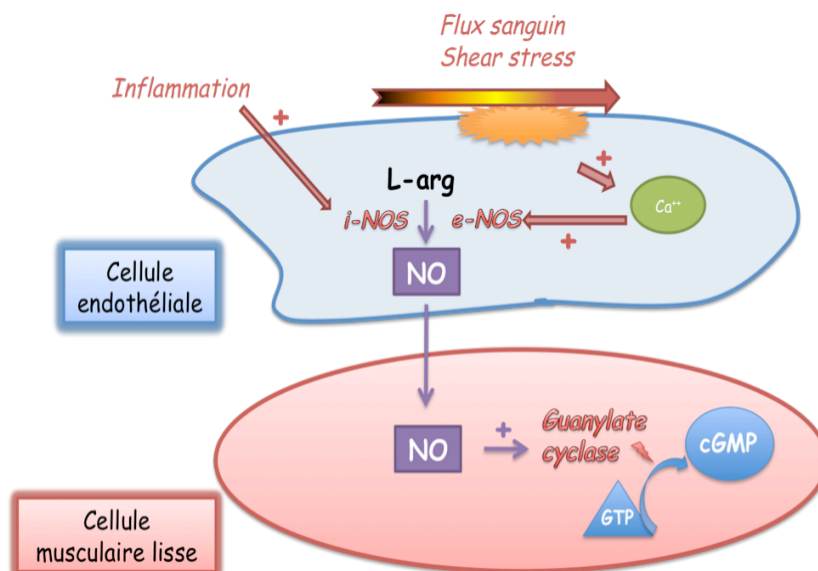
Le monoxyde d'azote (NO) est un important médiateur vaso-relaxant d'origine endothéliale. Le NO est produit par la transformation de l'arginine par la NOSynthase (NOS) qui peut être de 3 types :

-NOS endothéliale (NOSe) constitutive

-NOS inductible (NOSi) des cellules inflammatoires

-NOS neuronale, constitutive produite par certains axones du système nerveux autonome.

Cette enzyme exerce son action vasodilatatrice et antiproliférative par l'action de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc).

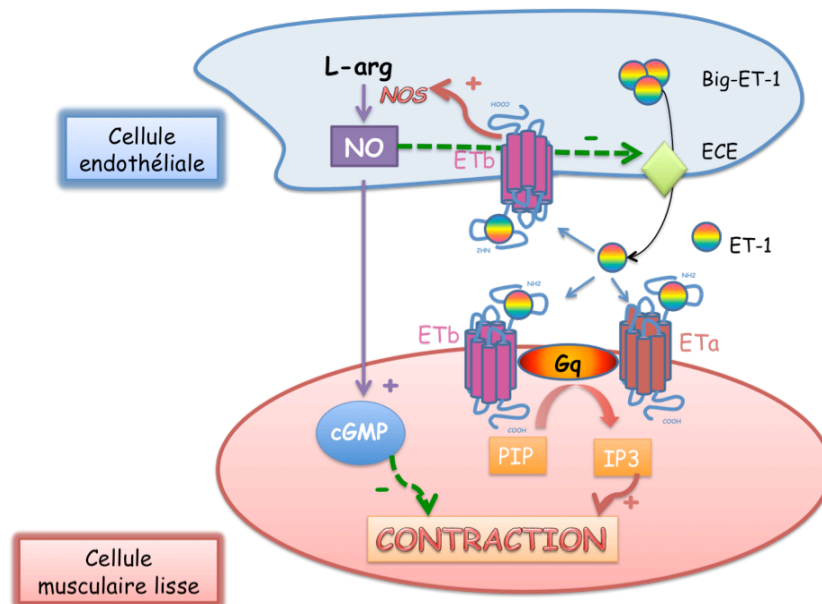


La NOSe est une enzyme endothéliale constitutive activée par les forces de cisaillement du flux vasculaire. Son activation est immédiate par l'intermédiaire du calcium et ne dépend donc pas de son niveau de transcription. Cependant, lorsque le stimulus d'activation persiste, l'expression transcriptionnelle de l'enzyme diminue (65) participant au défaut de vasodilatation.

Une stratégie thérapeutique dans l’HTPPE vise à augmenter la vasodilatation pulmonaire dépendante du NO et médiée par la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), en inhibant les phosphodiésterases de type 5 qui dégradent la GMPc (66, 67).

ii. Endothéline

L’endothéline est un puissant vasoconstricteur libéré par l’endothélium. Ce peptide possède au moins 3 isoformes : ET-1, ET-2 et l’ET-3. Il semble que seul L’ET-1 soit impliqué dans l’HTP(68).



L’ET-1 agit par liaison à 2 types de récepteurs spécifiques : ET_A et ET_B. L’action proliférative de l’ET-1 sur les cellules musculaires lisses des artères musculaires est médiée via les deux sous-types du récepteur de l’ET-1, ET_A et ET_B.

iii. Sérotonine (5-HT)

La 5-HT est produite par les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal et par les corps neuroépithéliaux pulmonaires, puis stockée dans les plaquettes. Elle est impliquée dans l’HTP primitive (69-71). L’élévation des taux plasmatiques n’a jamais été démontrée dans l’HTPPE (72, 73).

iv. Prostacycline/Prostaglandine I₂ (PG I₂)

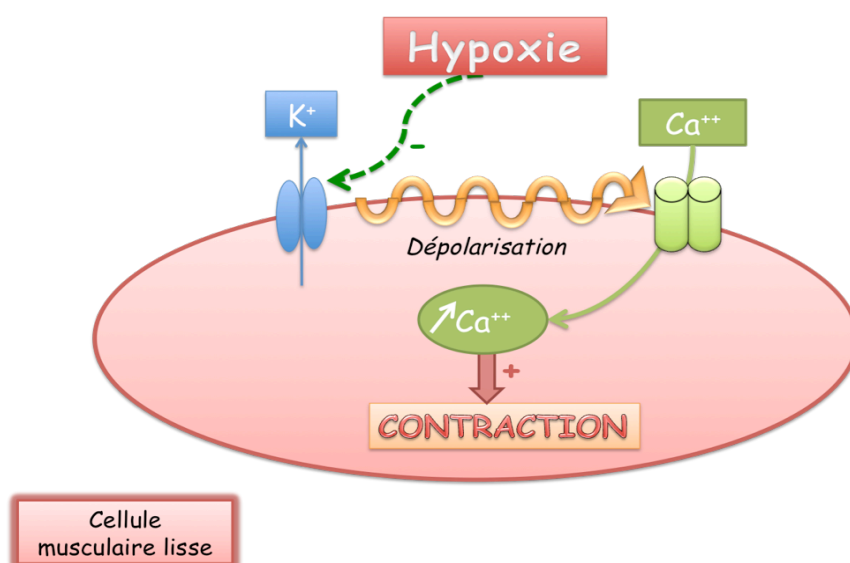
La prostacycline (prostaglandine I₂) est un vasodilatateur pulmonaire endogène important qui agit par le biais de l'activation de voies dépendantes de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Elle inhibe également la prolifération des cellules musculaires lisses et diminue l'agrégation plaquettaire. Sa synthèse est diminuée dans les cellules endothéliales pulmonaires de patients atteints d'HTP, comme le montre la réduction dans ces cellules de l'expression de la prostacycline synthase(74). Sans aucune preuve de son implication dans l'HTPPE certaines équipes l'utilisent en complément du traitement chirurgical (75-77).

b. Dysfonction de la cellule musculaire lisse

La néomuscularisation des petites artères pulmonaires périphériques normalement non musculaires, jusque dans l'acinus respiratoire, est une caractéristique commune à toutes les formes de remodelage associées à l'HTP.

i. Canaux potassiques

C'est l'inhibition d'un ou plusieurs canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires résistives par l'hypoxie qui engendre une vasoconstriction pulmonaire. La dépolarisation membranaire qui en résulte augmente l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants conduisant à une élévation de la concentration cytosolique en calcium avec pour conséquence l'initiation de la contraction.



La perte sélective de certains de ces canaux Kv entraîne une dépolarisation des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, augmente la concentration de calcium intracellulaire et conduit à la fois à une vasoconstriction et à une prolifération cellulaire (78-81). Même si l'implication directe des canaux potassiques n'a jamais été prouvée dans la physiopathologie de l'HTPPE, l'ischémie chronique post-obstructive doit provoquer l'inhibition de certains de ces canaux Kv.

ii. Mutation BMPR-2

Il est actuellement admis par certains que, comme pour d'autres formes d'HTP, il pourrait exister une susceptibilité génétique favorisant le développement d'une HTPPE. Des mutations du gène BMPR-2 (*bone morphogenic protein receptor II*) ont été décrites dans plus de la moitié des HTP familiales et dans 10 à 30% des HTP idiopathiques (22, 23, 82). On sait maintenant que ces mutations BMPR-2 participent au remodelage vasculaire en favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses. Des mutations de ce type n'ont, toutefois, jamais été décrites dans l'HTPPE (73).

c. Dysfonction de la matrice extracellulaire

i. Le TGF- β

Le TGF- β est connu pour augmenter la production de matrice extracellulaire. Dans les fibroblastes pulmonaires humains, le TGF- β augmente l'expression d'élastine par stabilisation de ses ARNm. Ainsi, il est possible que l'augmentation de l'expression d'élastine observée dans l'HTP soit due à une altération de cette voie(83, 84). L'implication du TGF- β dans la physiopathologie de l'HTPPE a été démontrée en association avec un sepsis à staphylocoque dans un modèle murin(38).

ii. La protéolyse

L'observation d'une dégradation de l'élastine dans les artères pulmonaires de patients porteurs d'une cardiopathie congénitale et d'une HTP font suggérer que la protéolyse de la matrice extracellulaire est un mécanisme important dans la physiopathologie des maladies vasculaires pulmonaires(85). Le mécanisme impliqué passerait par l'activation de la MAP kinase et la séquestration nucléaire d'AML1. AML1 est un facteur de transcription pour le gène de l'élastase neutrophilique et un facteur de transcription supposé du gène de l'élastase vasculaire endogène(86).

2. Angiogénèse

a. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

Le VEGF est capable d'induire la prolifération des cellules endothéliales vasculaires par le biais de deux récepteurs tyrosine kinase à haute affinité (VEGFR-1 et -2). Dans l'HTP, l'expression du VEGF est accrue dans les vaisseaux pulmonaires (87, 88).

L'isoforme B du VEGF semble, sur un modèle murin, accentuer le remodelage puisque des souris invalidées pour *VEGF-B* exposées à une hypoxie chronique ont un remodelage vasculaire significativement moindre par comparaison aux souris sauvages (89). Au contraire, des études animales récentes ont souligné les effets positifs du VEGF-A dans des modèles d'HTP(90).

b. PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*)

Le PDGF est un facteur de croissance ubiquitaire synthétisé par de nombreux types cellulaires au premier rang desquels les cellules endothéliales et musculaires lisses artérielles pulmonaires. Au-delà de sa fonction proliférante pour les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires, le PDGF est aussi capable d'induire la contraction d'anneaux aortiques et d'induire la migration musculaire lisse artérielle pulmonaire. Son implication dans le remodelage vasculaire pulmonaire de l'HTP est donc majeure(91-93). Dans la stratégie thérapeutique de l'HTP de nombreuses équipes utilisent aujourd'hui des inhibiteurs du PDGF (Imatinib)(94, 95).

c. Angiopoïétine (Ang-1)

L'Ang-1 est un facteur angiogénique essentiel au développement vasculaire pulmonaire. Produit par les cellules musculaires lisses et les péricytes précurseurs, l'angiopoïétine-1 se fixe sur son récepteur Tie2 situé sur les cellules endothéliales et stimule le recrutement, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses autour des cellules endothéliales pendant la formation du réseau vasculaire. Une fois les vaisseaux formés, l'expression d'angiopoïétine-1 disparaît (26). Les travaux de Du et al. ont montré une augmentation de la production d'Ang-1 et de la phosphorylation de Tie-2 dans l'HTPPE. De plus, cette augmentation est directement corrélée à la sévérité de la maladie(26).

L'angiopoïétine-1 induit de plus une inhibition de BMPR-1a au niveau de la cellule endothéliale provoquant ainsi une anomalie dans la voie de signalisation BMPR-2. Il en résulte une prolifération de la cellule endothéliale (CE) et de la cellule musculaire lisse (CML) vasculaire pulmonaire (26).

3. Inflammation

L'analyse histologique des poumons révèle également la présence d'infiltrats inflammatoires (macrophages et lymphocytes) au niveau des lésions plexiformes dans les HTP sévères, ainsi qu'une expression accrue des chimiokines RANTES et fractalkines au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire(96).

Des phénomènes inflammatoires pourraient également jouer un rôle significatif dans la physiopathologie de l'HTPPE. Ainsi, des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires MCP-1 (*Macrophage Chemoattractant Protein-1*) ont été retrouvés dans l'HTPPE et paraissent corrélés à la sévérité de l'HTP (21).

C. CONCLUSION

En conclusion, peu de données existent sur la biologie de l'HTPPE contrairement à celles concernant l'HTP. Cependant, les lésions histologiques de vasculopathie distale sont similaires aux lésions d'HTP et il est donc très probable qu'une grande partie des anomalies biologiques connues dans l'HTP sont identiques dans l'HTPPE. Un certain nombre d'équipes utilisent même les traitements issus de la recherche sur l'HTP dans la prise en charge des patients présentant une HTPPE par extrapolation des données scientifiques. Cependant au même titre qu'on ne pouvait pas résumer la maladie à l'obstruction vasculaire pulmonaire dans les années 1970, on ne peut pas résumer la maladie aujourd'hui à une atteinte microvasculaire. De ce fait l'approche thérapeutique réside certainement dans l'association des deux traitements (endartériectomie et traitement médical) chez les patients ayant des RPT très élevées en relation avec une importante vasculopathie distale (et peu d'obstruction vasculaire) (76).

HYPOTHÈSES

Le premier programme européen de TEP pour HTPPE a débuté en 1996 à l'Hôpital Marie Lannelongue sous l'impulsion du Pr Dartevelle au vu des résultats de l'équipe de San Diego (97). En dépit des améliorations de la technique chirurgicale (notamment l'apport de l'angioscopie), la mortalité post opératoire restait à environ 10%. Cette mortalité était due dans la majorité des cas à un œdème pulmonaire sévère ou à une persistance de l'hypertension pulmonaire malgré une bonne désobstruction chirurgicale. Les premiers travaux de recherche à Marie Lannelongue se sont intéressés à la modélisation du poumon en ischémie chronique et à sa reperfusion (54, 56).

La compréhension des mécanismes physiopathologiques de cet œdème pulmonaire de reperfusion post endartériectomie, puisque localisé dans les zones désobstruées, a été l'entame de ce travail. Nous avons ainsi étudié la viabilité de la cellule endothéliale pulmonaire en réponse à l'ischémie chronique et à la reperfusion.

La poursuite des recherches a ciblé l'autre complication majeure de l'intervention : la persistance de l'hypertension pulmonaire malgré une bonne désobstruction anatomique.

Nos recherches se sont donc portées sur le territoire vasculaire non obstrué des hypertensions pulmonaires post-emboliques. Il s'agissait, en effet, du territoire qui n'était pas modifié par la chirurgie donc susceptible d'expliquer cette complication. Dans un premier temps, nous avons modélisé les territoires non obstrués soumis, au début de la maladie, à un hyperdébit relatif par redistribution du débit cardiaque, lequel n'est pas encore abaissé. Nous nous sommes intéressés au mécanisme physiopathologique de l'apparition d'une maladie microvasculaire dans les territoires pulmonaires non obstrués. Nous avons émis l'hypothèse que les systèmes endothéline et angiopoïétine étaient impliqués dans la formation de cette vasculopathie pulmonaire distale. Après avoir démontré que l'endothéline-1 était impliquée dans cette vasculopathie des territoires pulmonaires en hyperdébit, nous avons étudié, dans le troisième travail, l'effet d'un antagoniste de l'endothéline-1 sur cette vasculopathie d'hyperdébit.

Enfin conscient que le modèle d'hyperdébit ne reflète qu'une partie de la maladie, et ayant constaté qu'aucun patient pneumonectomisé ne développait d'HTP nous avons

comparé un modèle d'hyperdébit, (pneumectomie droite), à un modèle mixte d'hyperdébit et d'obstruction vasculaire pulmonaire (ligature de l'artère pulmonaire droite) afin d'identifier des phénomènes d'interaction entre les 2 territoires.

PREMIÈRE ÉTUDE

Viabilité de la cellule endothéliale pulmonaire en réponse à l'ischémie chronique et à la reperfusion

Endothelial cell apoptosis in chronically obstructed and reperfused pulmonary artery

Edouard Sage, Olaf Mercier, Frederic Van den Eyden, Marc de Perrot, Anne Marie Barlier-Mur, Philippe Dartevelle, Saadia Eddahibi, Philippe Herve et Elie Fadel

Respir Res. 2008 Feb 12;9:19.

Poster Discussion à l'ATS San Francisco 2007 : Overexpression of pro-apoptotic factors in chronically obstructed and reperfused pulmonary artery.

Présentation Orale à l'ERS Stockholm 2007: Overexpression of pro-apoptotic factors in chronically obstructed and reperfused pulmonary artery.

Pulmonary Arterial Hypertension research Award 2007 de l'ERS (10000euros) : Overexpression of pro-apoptotic factors in chronically obstructed and reperfused pulmonary artery.

Nous avons voulu démontrer par ce travail que la dysfonction endothéliale qui se produit lors de l'ischémie chronique et la reperfusion (54, 55) était corrélée avec une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons étudié dans un modèle porcin (55), comment l'obstruction chronique suivie de la reperfusion d'une artère pulmonaire pouvait modifier la fonction de la cellule endothéliale, la vasoréactivité pulmonaire et l'apoptose des cellules endothéliales.

Nous nous sommes ensuite attachés à expliquer ce mécanisme apoptotique en comparant l'expression de certains gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.

Et finalement, nous avons testé la pentoxifylline, molécule anti-apoptotique non sélective, sur la viabilité de la cellule endothéliale en réponse à l'ischémie chronique et à la reperfusion.

Cette ischémie est obtenue par la ligature de l'artère pulmonaire gauche en intrapéricardique. La reperfusion de ce poumon ischémique se fait in vivo par la réimplantation de l'artère liée dans le tronc de l'artère pulmonaire par thoracotomie gauche. Pour cette étude 25 porcelets seront utilisés et répartis en 5 groupes.

- Un groupe ischémie chronique (5 semaines de ligature)
- Un groupe reperfusion aiguë (5 semaines de ligature + 2 jours de reperfusion)
- Un groupe reperfusion chronique (5 semaines de ligature + 5 semaines de reperfusion)
- Un groupe reperfusion aiguë + Pentoxifylline
- Un groupe témoin

1. Résultats

a. Apoptose de la cellule endothéliale

Le nombre de cellules endothéliales (CE) apoptotiques augmente significativement après 5 semaines de ligature artérielle. Le pourcentage de CE apoptotiques augmente

après 2 jours de reperfusion avant de retourner à des valeurs normales à 5 semaines de reperfusion.

L'activité Caspase-3 des CE a la même cinétique de variation en réponse à l'ischémie chronique et à la reperfusion.

b. La fonction endothéliale

La relaxation maximale en réponse à l'acétylcholine et au calcium ionophore est diminuée de façon significative dans le groupe reperfusion aiguë.

De même le taux de la protéine NOS-e est diminué dans le groupe reperfusion aiguë.

c. Expression des gènes VEGF, β FGF, Thps-1 et PAI-1 dans le tissu pulmonaire après ischémie chronique et reperfusion :

Il n'existe aucune modification dans l'expression des gènes anti-apoptotiques que sont le VEGF et le β FGF entre les différents groupes.

Par contre, l'expression des gènes pro-apoptotiques Thps-1 et PAI-1 est significativement augmentée en fin d'ischémie chronique. Après la reperfusion l'expression de ces gènes retourne à des valeurs normales.

d. Effet de la Pentoxifylline sur l'apoptose

L'injection de pentoxifylline juste avant la reperfusion permet une diminution importante du taux de cellules endothéliales apoptotiques. Cette décroissance n'atteint cependant pas les valeurs du groupe témoin.

e. Effet de la pentoxifylline sur la fonction endothéliale

L'adjonction de pentoxifylline à la reperfusion permet une relaxation maximale en réponse à l'acétylcholine et au calcium ionophore augmentée par rapport au groupe reperfusion seule. Cependant cette relaxation reste diminuée par rapport au groupe témoin.

2. Conclusion

Cette étude a permis de démontrer qu'il existe une sur-expression des gènes pro-apoptotiques dans l'ischémie chronique pulmonaire.

De plus, ce travail a permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'œdème de reperfusion, en mettant en évidence une augmentation de la dysfonction endothéliale liée à une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales.

Les résultats encourageants apportés par l'adjonction d'une molécule anti-apoptotique avant la reperfusion ouvrent des voies thérapeutiques de contrôle de l'œdème pulmonaire post-endartériectomie.

Research

Open Access

Endothelial cell apoptosis in chronically obstructed and reperfused pulmonary artery

Edouard Sage*¹, Olaf Mercier¹, Frederic Van den Eyden¹, Marc de Perrot¹, Anne Marie Barlier-Mur², Philippe Dartevelle¹, Saadia Eddahibi², Philippe Herve¹ and Elie Fadel¹

Address: ¹UPRES EA2705, Laboratoire de Chirurgie Expérimentale, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France and ²INSERM U841, Hôpital H. Mondor, AP-HP, Créteil, France

Email: Edouard Sage* - edouardsage@yahoo.fr; Olaf Mercier - o.mercier@ccml.fr; Frederic Van den Eyden - fvandenyden@hotmail.com; Marc de Perrot - marcdeperrot@hotmail.com; Anne Marie Barlier-Mur - barliermur@im3.inserm.fr; Philippe Dartevelle - p.dartevelle@ccml.fr; Saadia Eddahibi - eddahibi@im3.inserm.fr; Philippe Herve - p.herve@ccml.fr; Elie Fadel - e.fadel@ccml.fr

* Corresponding author

Published: 12 February 2008

Received: 10 November 2007

Respiratory Research 2008, **9**:19 doi:10.1186/1465-9921-9-19

Accepted: 12 February 2008

This article is available from: <http://respiratory-research.com/content/9/1/19>

© 2008 Sage et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Endothelial dysfunction is a major complication of pulmonary endarterectomy (PTE) that can lead to pulmonary edema and persistent pulmonary hypertension. We hypothesized that endothelial dysfunction is related to increased endothelial-cell (EC) death.

Methods: In piglets, the left pulmonary artery (PA) was ligated to induce lung ischemia then reimplanted into the main PA to reperfuse the lung. Animals sacrificed 5 weeks after ligation ($n = 5$), 2 days after reperfusion ($n = 5$), or 5 weeks after reperfusion ($n = 5$) were compared to a sham-operated group ($n = 5$). PA vasoreactivity was studied and eNOS assayed. EC apoptosis was assessed by TUNEL in the proximal and distal PA and by caspase-3 activity assay in the proximal PA. Gene expression of pro-apoptotic factors (thrombospondin-1 (Thsp-1) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)) and anti-apoptotic factors vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) was investigated by QRT-PCR.

Results: Endothelium-dependent relaxation was altered 5 weeks after ligation ($p = 0.04$). The alterations were exacerbated 2 days after reperfusion ($p = 0.002$) but recovered within 5 weeks after reperfusion. EC apoptosis was increased 5 weeks after PA ligation ($p = 0.02$), increased further within 2 days after reperfusion ($p < 0.0001$), and returned to normal within 5 weeks after reperfusion. Whereas VEGF and bFGF expressions remained unchanged, TSP and PAI-1 expressions peaked 5 weeks after ligation ($p = 0.001$) and returned to normal within 2 days after reperfusion.

Conclusion: Chronic lung ischemia induces over-expression of pro-apoptotic factors. Lung reperfusion is followed by a dramatic transient increase in EC death that may explain the development of endothelial dysfunction after PE. Anti-apoptotic agents may hold considerable potential for preventing postoperative complications.

Background

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is due to chronic obstruction of large pulmonary arteries by organized blood clots after one or more episodes of acute pulmonary embolus [1,2]. CTEPH, initially thought to be rare, is being increasingly diagnosed, probably because effective medical and surgical treatments have been developed driven by progress in diagnostic tools [3]. Pulmonary thromboendarterectomy (PTE) is the treatment of choice for patients with CTEPH, as it restores perfusion to previously occluded zones and normalizes pulmonary vascular resistance [2]. However, PTE is associated with two major complications, persistent pulmonary hypertension and acute pulmonary edema, both of which can be related to endothelial cell (EC) dysfunction [4-6].

ECs play a pivotal role in preserving vascular integrity and preventing thrombosis. Good EC function is essential to maintain vascular homeostasis in health and disease. Apoptosis is among the biological processes that regulates EC number. EC death has been documented after ischemia and reperfusion in several organs [7,8]. Acute lung ischemia and reperfusion induced apoptosis in over 30% of parenchymal lung cells in humans and animal models after lung transplantation [9,10]. Thus, increased apoptosis may contribute substantially to the development of many of the adverse events seen after PTE, most notably pulmonary edema and persistent pulmonary hypertension.

The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic factors determines the overall amount of apoptosis. Therefore, we investigated whether expression of genes for pro-apoptotic and anti-apoptotic factors was affected by chronic lung ischemia and reperfusion. We studied two pro-apoptotic factors, thrombospondin-1 (Thsp-1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and two anti-apoptotic factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). Our working hypothesis was that abnormal expression of these pro-apoptotic and anti-apoptotic factors during chronic lung ischemia and reperfusion was associated with increased EC apoptosis and endothelial dysfunction. To evaluate this hypothesis, we investigated whether chronic pulmonary artery (PA) obstruction followed by reperfusion in piglets altered EC function and pulmonary vascular reactivity and/or EC apoptosis. Should such alterations be documented, we planned to investigate their mechanism, most notably the balance of pro-apoptotic and anti-apoptotic gene expressions. Finally, we investigated the effects of pentoxifylline, a nonselective anti-apoptotic factor, on EC viability and function in our ischemia/reperfusion model.

Methods

Experimental design

Groups

We used 50 piglets with a mean weight of 21.8 ± 3.9 kg. All procedures were approved by our institutional animal care committee.

In the first part of the study, we assessed EC apoptosis and endothelial function during chronic ischemia-reperfusion of the left lung induced by left PA ligation and re-anastomosis, which were performed as previously described [5,6]. The second part of the study investigated whether pentoxifylline prevented EC apoptosis and improved endothelial function after reperfusion.

The piglets were randomly divided into four groups of 10 animals. Animals were killed 5 weeks after ligation of the left PA (ligated group), 2 days after re-anastomosis of the left PA previously ligated for 5 weeks (acute reperfusion group), 5 weeks after re-anastomosis of the left PA previously ligated for 5 weeks (chronic reperfusion group), or 5 weeks after left PA dissection without ligation (sham group).

Tissue preparation

After heparin administration, the animals were killed by exsanguination. The left lung was removed from each animal and the PA flushed with 500 ml of 0.9% normal saline solution. The proximal PA was harvested down to the sub-segmental division, and samples from the peripheral third of the lung parenchyma were examined. The proximal and distal ECs of the left PA were examined separately.

Baseline wet-lung weight was estimated by measuring the weight of the left lung at the end of the experiment. They were then dried in an oven at 60°C. Dry weights were obtained after the weights no longer changed on successive weighings (i.e., after about 30 d). The wet to dry-lung weight ratio was then determined.

Detection of apoptotic cells

TUNEL assay

Cells undergoing apoptosis were detected using the ApopTag® Red *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Qbiogene, Illkirch, France), as specified by the manufacturer. Briefly, paraffin-embedded sections were deparaffinized and pre-treated with proteinase K (20 µg/ml) for 15 minutes. Equilibration buffer was added directly onto the specimen, after which terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme in reaction buffer was added for 1 hour at 37°C. Sections were washed in working strength Stop/Wash buffer for 10 minutes. Pre-warmed working strength anti-digoxigenin conjugate (rhodamine) was added to the sections and incubated at room temperature for 30 min-

utes. The samples were washed with PBS and observed under a fluorescence microscope after Hoechst staining (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Then, ECs in the proximal and distal PA were counted in a blinded fashion by two investigators working independently from each other, and the proportion of ECs undergoing apoptosis was calculated. The mean of the two counts by the two investigators was taken.

Caspase 3 Activity

Activity of the enzyme caspase 3 was measured using a colorimetric assay kit (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions.

Endothelial cell function

Pulmonary artery reactivity

At the end of the study, intrapulmonary arterial segments were dissected out, and endothelial relaxation was investigated as described previously [11]. Acetylcholine hydrochloride, calcium ionophore A23187, and sodium nitroprusside were used for relaxation after precontraction to phenylephrine.

Lung eNOS Protein

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein was measured by Western blot in homogenized lung tissue as described previously [11].

Gene expression analysis by real-time quantitative RTQ-PCR

We used real-time quantitative polymerase-chain-reaction technology (RTQ-PCR) to measure the expression of genes for vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), thrombospondin-1 (Thps-1), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). RNA was extracted using Trizol reagent (Gibco Life Technologies, Maryland, USA). RNA concentration and quality were determined by electrophoresis on agarose gel and spectrophotometry. Then, reverse transcription was performed using random hexamer primers and reverse transcriptase (Biotech Ltd, UK). PCR primers were designed using Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster, CA). To avoid inappropriate amplification of residual genomic DNA, intron-spanning primers were selected and internal control 18S rRNA primers provided. For each sample, the amplification reaction was performed in duplicate using SyberGreen mix and specific primers. Signal detection and result analysis were achieved using ABI-Prism 7000 sequence detection software (Applied Biosystems, Foster, CA). Expression of the gene of interest was computed relative to expression of the internal standard mRNA, r18S, using the following formula: relative mRNA = $1/2^{(Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{18S})}$.

Effect of pentoxifylline

To investigate whether an anti-apoptotic drug, pentoxifylline [12], prevented EC damage and dysfunction, we studied 10 additional piglets, whose left PA was ligated for 5 weeks then reperfused for 2 days. A pentoxifylline bolus (40 mg) was injected into the left PA immediately before reperfusion. The results in this group (pentoxifylline group) were compared to those in the acute reperfusion group and sham group.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. One-way analysis of variance and simple linear regression studies were done using the Statview software package version 5 (Abacus Concept, Berkeley, CA). Probability values less than 0.05 were considered significant.

Results

Ischemial/reperfusion induced endothelial-cell apoptosis

Significant EC apoptosis was found in the proximal left PA 5 weeks after ligation ($14.8 \pm 1\%$ versus $8.1 \pm 1.8\%$ in sham animals; $p < 0.0001$). The proportion of apoptotic endothelial cells peaked 2 days after reperfusion ($42.9 \pm 1.9\%$) and returned to control values 5 weeks after reperfusion ($9.8 \pm 1.6\%$) (Figure 1A, B)

Caspase-3 activity in the proximal PA followed a similar pattern, but the increase fell short of statistical significance at the end of the ischemic period (Figure 1C). Caspase-3 activity increased significantly after reperfusion (0.101 ± 0.028 mg/ml versus 0.019 ± 0.008 mg/ml in the sham animals; $p < 0.0001$) and returned to control values within 5 weeks after reperfusion (0.034 ± 0.015 mg/ml).

Similarly, in the distal PAs, the proportion of apoptotic ECs increased significantly during the ischemic period ($18.9 \pm 3.9\%$ versus $6.6 \pm 1.8\%$ in sham animals; $p < 0.0001$), peaked 2 days after reperfusion ($46.4 \pm 4.5\%$), and returned to control values within 5 weeks after reperfusion (Figure 2A, B). The proportions of apoptotic ECs in the proximal and distal PAs correlated significantly with each other ($p < 0.0001$, $R = 0.97$).

Effect of ischemial/reperfusion on endothelial function

Neither PA contraction to phenylephrine nor PA relaxation response to sodium nitroprusside was affected by ligation or reperfusion. However, maximal relaxation in response to acetylcholine (Figure 3) was lower in the acute reperfusion group than in the sham ($p = 0.0001$) groups, although no significant differences in acetylcholine EC₅₀ were noted across the three groups. Moreover, maximal relaxation in response to calcium ionophore (Figure 3) was lower in the acute reperfusion group than in the sham group. The EC₅₀ to calcium ionophore was lower in the sham group than in the acute reperfusion group. The

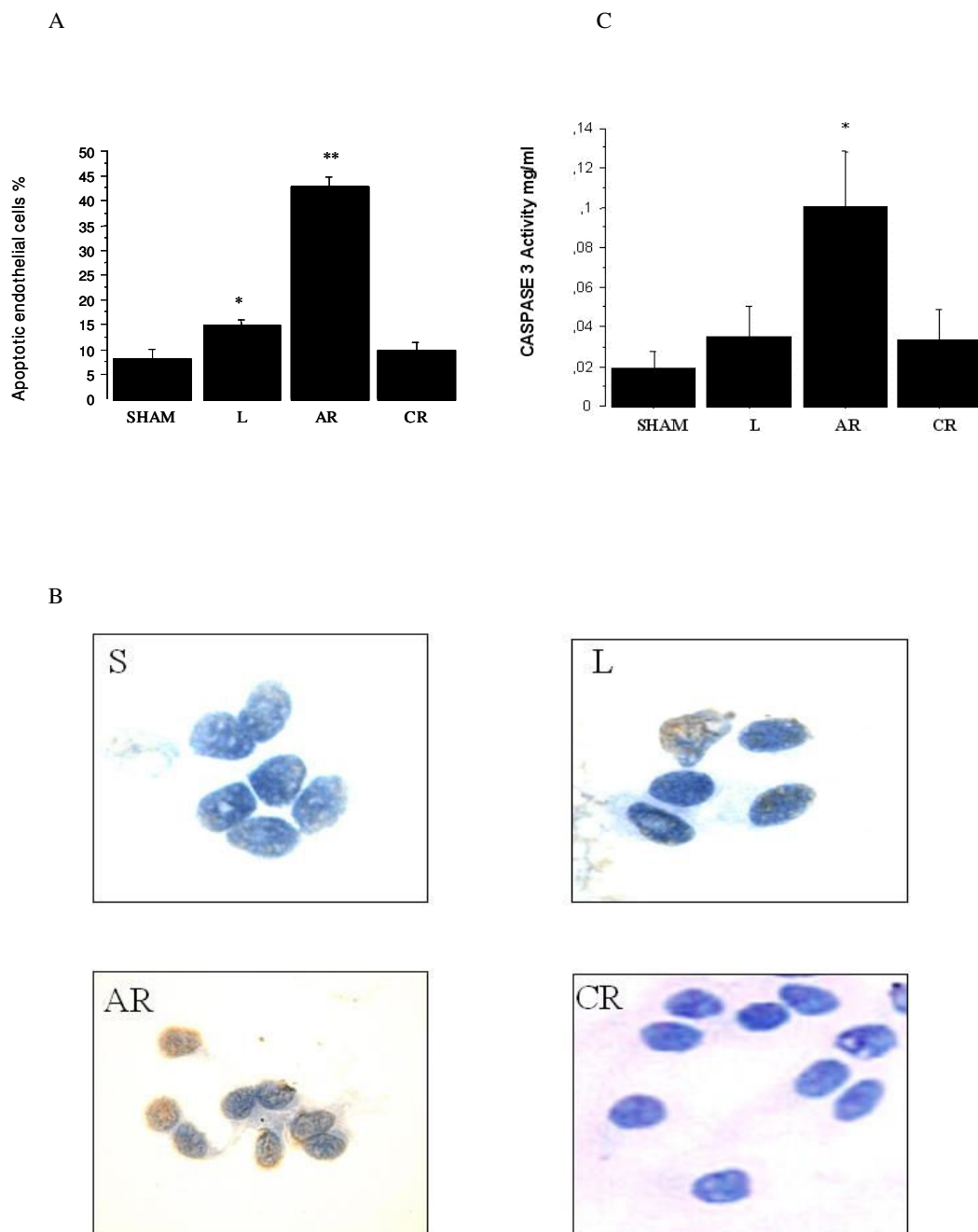


Figure 1

A: Proportion of endothelial cells undergoing apoptosis in the proximal pulmonary arteries. The proportion increased significantly from $8.1 \pm 1.8\%$ in sham animals (S) to $14.8 \pm 1\%$ 5 weeks after ligation of the left pulmonary artery (L), peaked at $42.9 \pm 1.9\%$ 2 days after reperfusion (AR), and returned to $9.8 \pm 1.6\%$ 5 weeks after reperfusion (CR). * $p < 0.0001$ versus sham, ** $p < 0.0001$ versus all other groups. S: sham group; L: ligated group; AR: acute reperfusion group; CR: chronic reperfusion group. **B:** TUNEL staining of endothelial cells in the sham group, ligated group, acute reperfusion group after 2 days, and chronic reperfusion group after 5 weeks. Apoptotic cells are yellow. S: sham group; L: ligated group; AR: acute reperfusion group; CR: chronic reperfusion group. **C:** Caspase-3 activity in the proximal pulmonary arteries. Caspase-3 activity increased from 0.019 ± 0.008 mg/ml in sham animals (S) to 0.035 ± 0.015 mg/ml 5 weeks after ligation of the left pulmonary artery (L), peaked at 0.101 ± 0.028 mg/ml 2 days after reperfusion (AR), and returned to 0.034 ± 0.015 mg/ml after 5 weeks of reperfusion (CR). * $p < 0.0001$ versus sham.

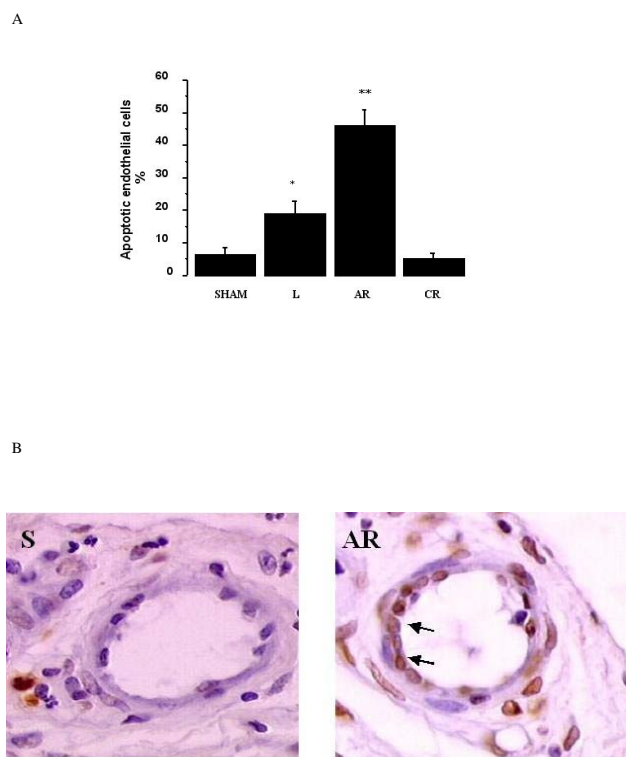


Figure 2

A: Proportion of endothelial cells undergoing apoptosis in the distal pulmonary arteries. The proportion increased significantly from $6.6 \pm 1.8\%$ in sham animals (S) to $18.9 \pm 3.9\%$ 5 weeks after ligation of the left pulmonary artery (L), peaked at $46.4 \pm 4.5\%$ 2 days after reperfusion (AR), and returned to $5.4 \pm 1.5\%$ 5 weeks after reperfusion (CR). * $p < 0.0001$ versus sham animals, ** $p < 0.0001$ versus all other groups. S: sham group; L: ligated group; AR: acute reperfusion group; CR: chronic reperfusion group. **B:** TUNEL staining of endothelial cells in pulmonary artery branches ranging from 20 to 200 μm . Apoptotic cells are yellow (arrows). S: sham group; L: ligated group; AR: acute reperfusion group; CR: chronic reperfusion group.

impairment in endothelium-dependent relaxation seemed correlated to the steady state of eNOS protein levels: eNOS protein was significantly decreased in the acute reperfusion group compared to the sham group (Figure 4).

Wet to dry ratios were not significantly different among the four groups.

Gene expression in lung tissue from piglets with chronic ischemia/reperfusion

No changes in levels of VEGF or bFGF mRNA were detected during ischemia or reperfusion (Figure 5A). However, Thps-1 and PAI-1 mRNAs peaked at the end of the ischemic period ($p = 0.0003$ and $p = 0.0025$, respec-

tively when compared to sham group). After reperfusion, expression levels decreased significantly ($p = 0.0008$ and $p = 0.0163$, respectively compared to the values found after the ischemic period) and returned towards normal values. (Figure 5B).

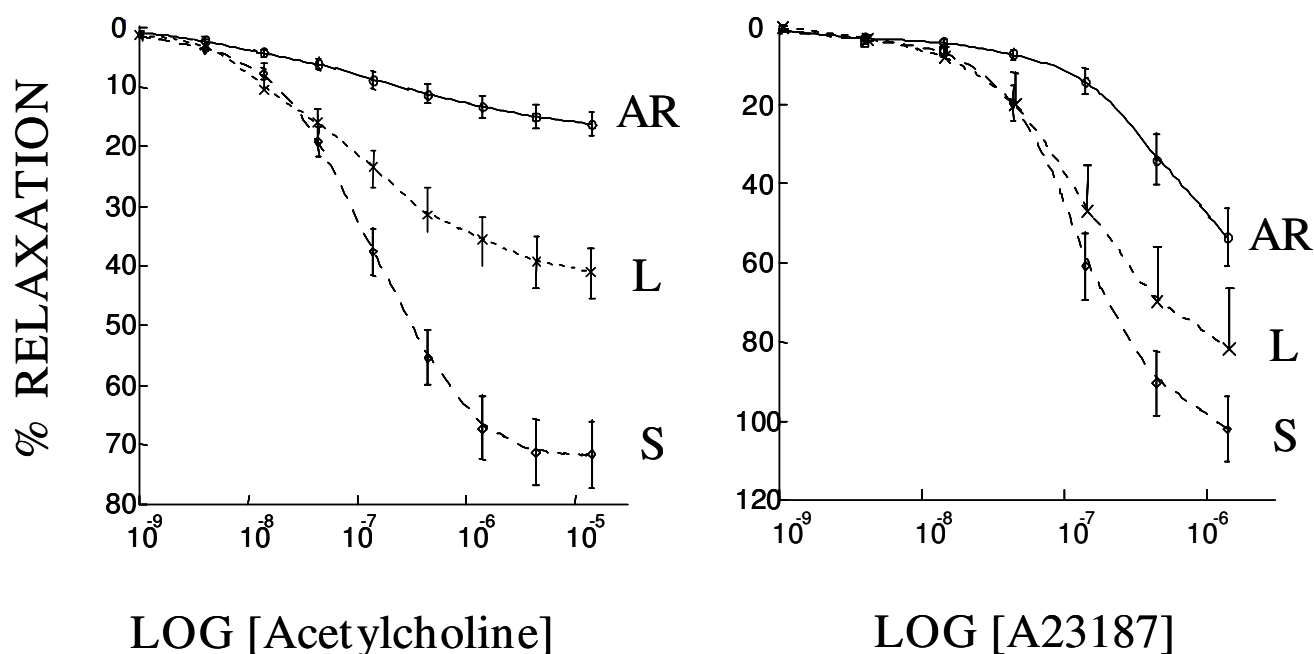
Effect of pentoxifylline

Injecting pentoxifylline immediately before reperfusion resulted in a significant decrease in the proportion of apoptotic ECs in the distal PA, from $46.4 \pm 4.5\%$ to $36.3 \pm 2.9\%$ ($p < 0.0001$). However, the proportion of apoptotic cells remained higher than in the sham group ($6.6 \pm 1.8\%$; $p < 0.0001$) (Figure 6A). Neither contraction to phenylephrine nor relaxation to sodium nitroprusside were affected by PA ligation or reperfusion. However, maximal relaxation in response to acetylcholine (Figure 6B) was lower in the acute reperfusion group than in the pentoxifylline ($p = 0.0001$) and sham ($p = 0.0001$) groups; it was higher in the sham group than in the pentoxifylline group ($p = 0.01$). No differences in acetylcholine EC_{50} were seen across the three groups. Maximal relaxation in response to calcium ionophore was lower in the acute reperfusion group than in the pentoxifylline ($p = 0.002$) and sham ($p = 0.0001$) groups; it was higher in the sham group than in the pentoxifylline group ($p = 0.001$). The EC_{50} to calcium ionophore was lower in the acute reperfusion and pentoxifylline groups ($1.35 \cdot 10^{-7} \pm 1.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ versus $3.39 \cdot 10^{-7} \pm 1.2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $p = 0.0001$; and versus $4.07 \cdot 10^{-7} \pm 1.9 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $p = 0.0001$). The EC_{50} to calcium ionophore was similar in the acute reperfusion and pentoxifylline groups.

Reperfusion was followed by a significant decrease in eNOS protein (acute reperfusion group versus sham group). However, no significant difference was found between the acute reperfusion group and the pentoxifylline group (Figure 6C).

Discussion

This study provides the first evidence that chronic lung ischemia followed by reperfusion is associated with significant EC apoptosis in proximal and distal PAs. EC apoptosis occurred during chronic lung ischemia, reached 46% 2 days after reperfusion, and returned to control values within 5 weeks after reperfusion. EC apoptosis was associated with significant endothelial function impairment, most notably regarding eNOS expression and nitric oxide synthesis. Our gene expression studies provided a likely explanation to the abnormalities in EC apoptosis and endothelial function. We found overexpression of the pro-apoptotic factors Thps-1 and PAI-1 after 5 weeks of PA ligation. Moreover, pentoxifylline injection before lung reperfusion protected against EC apoptosis and endothelial dysfunction. These data suggest prevention of EC death after reperfusion as a key target for treatments

**Figure 3**

Relative eNOS protein expression as assessed by densitometric quantification of endothelial nitric oxide synthase on immunoblots prepared from lung preparations in the sham group (S) acute reperfusion group (AR).

aimed at preventing the development of pulmonary edema and persistent pulmonary hypertension after PTE.

Apoptosis is the process of normal program to cell death that allows normal cell turnover and wall remodelling in blood vessels. Chronic PA occlusion, as occurs in CTEPH, may result in chronic pulmonary EC ischemia. However, the development of the bronchial circulation in areas of chronic PA occlusion has been shown to preserve pulmonary aerobic metabolism and to reduce the severity of lung oedema after reperfusion [6,11]. Interestingly, we showed that this systemic blood supply failed to prevent EC apoptosis in the reperfused PA bed, since almost half the ECs underwent apoptosis after reperfusion in our model. EC apoptosis occurred in both the proximal and the distal PA beds, as established not only by TUNEL assay but also by the dramatic increase in caspase-3 activation 2 days after reperfusion. This finding corroborates previous results made in the setting of acute ischemia-reperfusion injury of the lung and other organs [7-10].

Apoptosis is a quiet and well-organized cell death modality that is associated with less inflammation, compared to necrosis [13,14]. Apoptotic cells are phagocytized by macrophages before their membrane breaks down, so that their intracellular enzymes are not released. Apoptosis is

triggered and modulated by two pathways. The intrinsic pathway involves the mitochondria and is activated by reactive oxygen species; whereas the extrinsic pathway is activated when ligands bind to their receptors, for instance tumour necrosis factor alpha (TNF- α) to TNF-receptors and Fas-ligand to Fas. Activation is rapid for the intrinsic pathway but may take up to several hours for the extrinsic pathway [14]. Increased apoptosis immediately after reperfusion in human lung transplantation was first reported by Fischer et al. in 2000, who found a time-dependent increase in apoptotic cell numbers after transplant reperfusion [9,10]. Although they found almost no positive TUNEL staining after cold or warm ischemia, the number of apoptotic cells increased over time after reperfusion. Subsequent studies established that cell death consistently peaked after reperfusion, both when acute ischemia was followed by transplantation and when chronic ischemia was followed by PA revascularisation. We found that nearly half the ECs were apoptotic 2 days after reperfusion and that control levels of apoptosis were recovered within 5 weeks. Similarly, in a rat lung transplant model over 30% of cells in the lung parenchyma were apoptotic 2 hours after reperfusion [10]. The peak in apoptotic cell number coincided with the peak of caspase-3 activity in our model, supporting a crucial role for the caspase pathway in cell death activation.

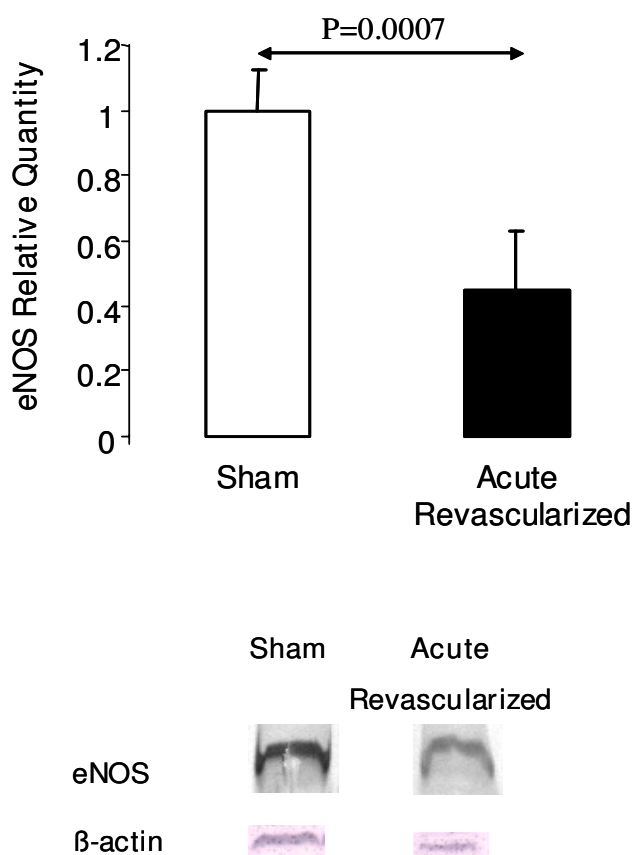


Figure 4
Percent reduction of maximal contraction to phenylephrine produced by acetylcholine stimulation and calcium ionophore stimulation of pulmonary artery rings taken from the left lungs of sham animals (S), animals with chronic ischemia (left pulmonary artery ligation for 5 weeks, L), and animals with acute reperfusion (revascularisation 2 days earlier, after ligation for 5 weeks, AR).

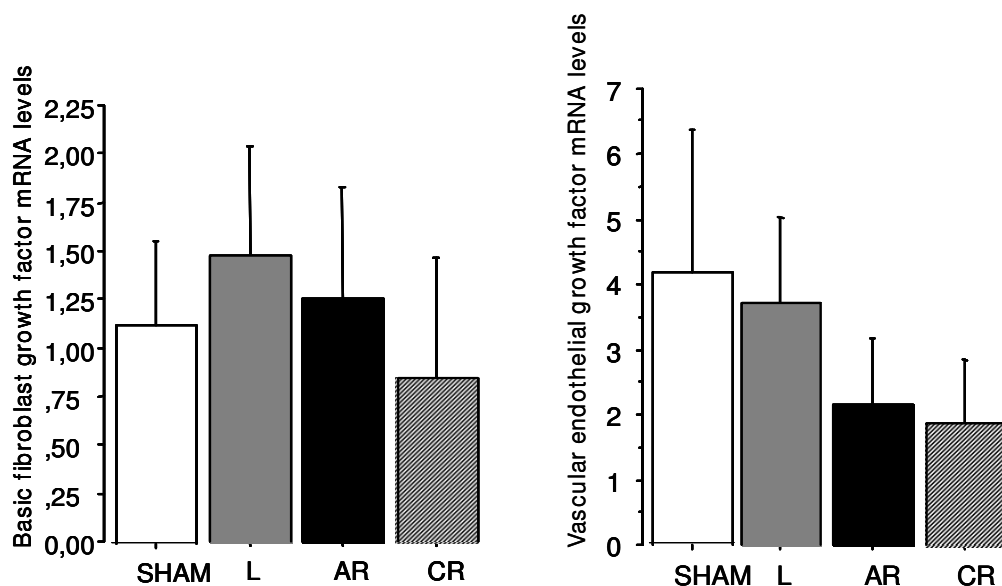
Increased EC death is the likely explanation to the endothelial function impairment, most notably the deficient nitric oxide production, documented in our study. A role for pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in pulmonary endothelial dysfunction has been hypothesized. This hypothesis, however, had not been previously studied in PA endothelium exposed to chronic ischemia. We found significant increases in mRNAs for two potent pro-apoptotic factors, Thsp-1 and PAI-1, in lung tissue exposed to chronic ischemia. In contrast, VEGF and bFGF remained unchanged. After reperfusion, pro-apoptotic protein expression returned to control values, although EC apoptosis increased to its peak. These results suggest that chronic lung ischemia induces overexpression of pro-apoptotic factors and that PA reperfusion after chronic ischemia may trigger massive EC apoptosis, leading to endothelial damage.

Our results indicating overexpression of pro-apoptotic proteins, including Thsp-1 and PAI-1, prompted us to investigate the effects of a nonselective inhibitor of EC apoptosis, pentoxifylline. Pentoxifylline is a potent anti-inflammatory agent that attenuates neutrophil-mediated lung injury and prevents EC dysfunction in several models of acute lung injury [12]. Pentoxifylline administration to patients with ischemic cardiomyopathy inhibited pro-inflammatory cytokines and reduced apoptosis by decreasing TNF- α and Fas concentrations in plasma [15]. Pentoxifylline probably prevents apoptosis both by inhibiting TNF- α production and by diminishing reactive oxygen species in our model. The extrinsic pathway can be activated during chronic ischemia via the release of cytokines (e.g., TNF- α) and of other proinflammatory mediators in the lung, whereas the intrinsic pathway can be triggered after reperfusion by the release of reactive oxygen species.

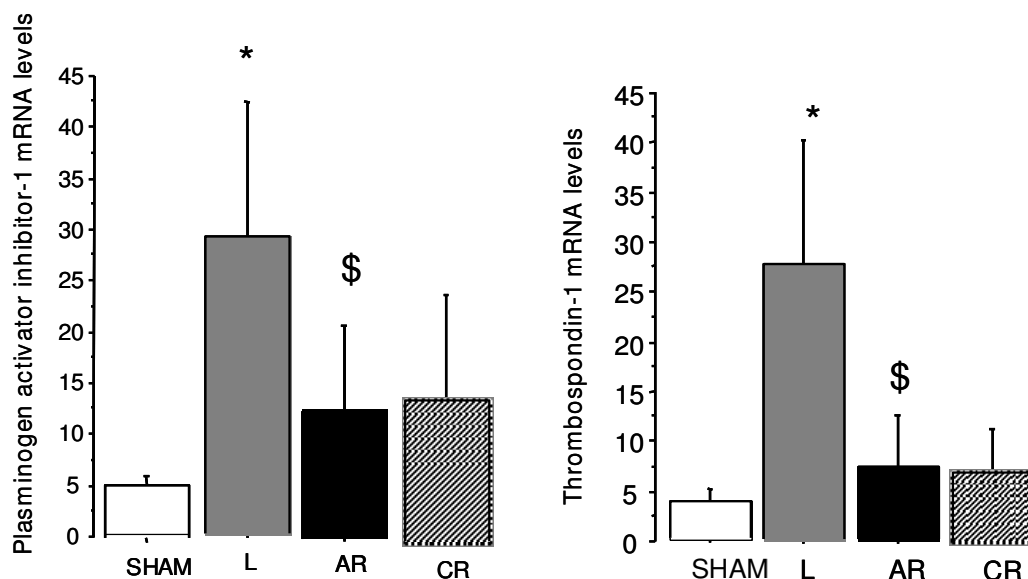
Reperfusion pulmonary edema is a major cause of morbidity and mortality after PTE for CTEPH that requires in prolonged mechanical ventilation and may be fatal [16,17]. Increased permeability of the small lung vessels is the underlying mechanism. Onset is usually within 24 hours after reperfusion and is associated with neutrophil activation and sequestration in the lung [18]. Arterial hypoxemia and radiographic infiltrates in the reperfused pulmonary segments are noted. Severity is variable, ranging from mild reperfusion injury manifesting only as focal infiltrates to severe alveolar flooding. Treatment is primarily supportive, with mechanical ventilation and pharmacological support. Extracorporeal support has been used in selected patients with overwhelming reperfusion injury. Our results suggest that massive EC death shortly after reperfusion may cause pulmonary edema and pulmonary hypertension mediated by endothelial cell dysfunction [6,11]. Thus, EC apoptosis may be among the primary causes of reperfusion pulmonary edema and persistent pulmonary hypertension, the two main complications of PTE. Therefore, anti-apoptotic therapy holds promise for improving outcomes after PTE for CTEPH. Blocking the apoptotic cascade before reperfusion diminished ischemia-reperfusion lung injury and improved graft function [19]. Similar results were obtained with other organs, such as the heart and kidney [20,21]. Caspase inhibitors are now available commercially and their potential benefits in transplant patients are being evaluated in clinical trials.

In conclusion, our results show that chronic lung ischemia is associated with overexpression of pro-apoptotic genes. A 46% rate of apoptosis and significant endothelial dysfunction were noted 2 days after reperfusion of chronically ischemic PA endothelium. EC apoptosis was significantly reduced by pentoxifylline injected

A



B

**Figure 5**

A: Relative expression of lung vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA in control piglets (sham) and animals exposed to chronic ligation (L) alone or followed by reperfusion for 2 days (acute reperfusion group, AR) or 5 weeks (chronic reperfusion group, CR). **B:** Relative expression of thrombospondin-1 and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA in control piglets (sham) and animals exposed to chronic ligation (L) alone or followed by reperfusion for 2 days (acute reperfusion group, AR) or 5 weeks (chronic reperfusion group, CR). Expression levels were significantly increased 5 weeks after ligation of the left pulmonary artery (L) (* $p = 0.0003$ and * $p = 0.0025$, respectively) and significantly decreased after acute reperfusion (AR) ($p = 0.0008$ and $p = 0.0163$, respectively).

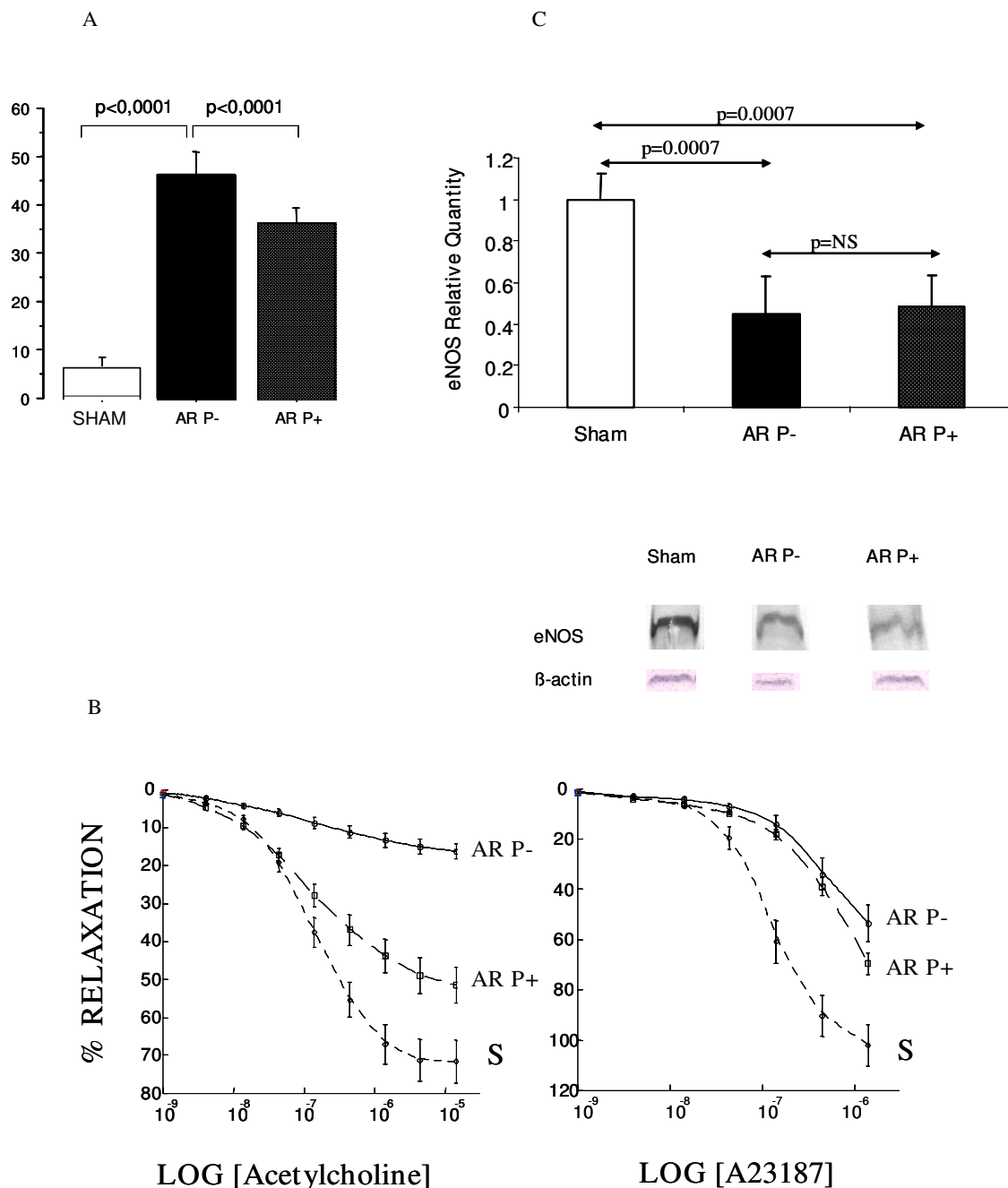


Figure 6

A: Proportion of endothelial cells undergoing apoptosis in the distal pulmonary arteries in the sham group and in piglets exposed to ligation for 5 weeks followed by reperfusion for two days, with (AR P+) or without (AR P-) pentoxifylline administration immediately before reperfusion. Typical results from two animals of each group are shown. **B:** Percent reduction of maximal contraction to phenylephrine produced by acetylcholine stimulation and calcium ionophore stimulation of pulmonary artery rings taken from left lungs 2 days after reperfusion with (AR P+) or without (AR P-) pentoxifylline administration (pentoxifylline+ and pentoxifylline-groups, respectively). Values are means ± SEM. The concentration-response curves were significantly flattened in the pentoxifylline-group and partially restored by administration of pentoxifylline. S: sham group; P-: acute reperfusion without pentoxifylline; P+: acute reperfusion with pentoxifylline. **C:** Western blot of eNOS protein content (mean ± SEM) 2 days after reperfusion with pentoxifylline (AR P+ group) or without pentoxifylline (AR P- group) compared to the sham group. Typical results from two animals of each group are shown.

immediately before lung reperfusion, which significantly improved endothelial function. EC death may explain reperfusion pulmonary edema and persistent pulmonary hypertension occurring immediately after PTE. Therefore, anti-apoptotic therapy holds considerable promise for preventing the severe complications in patients undergoing PTE.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Association chirurgicale pour le Développement et l'amélioration des Techniques de dépistage et de Traitement des Maladies Cardio-vasculaires (ADETEC).

References

- Fedullo PF, Auger WR, Kerr KM, Rubin LJ: **Chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** *N Engl J Med* 2001, **345**:1465-1472.
- Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, Chapelier A, Herve P, de Perrot M, Cerrina J, Ladurie FL, Lehouerou D, Humbert M, et al.: **Chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** *Eur Respir J* 2004, **23**:637-648.
- Pengo V, Lensing AW, Prins MH, Marchiori A, Davidson BL, Tiozzo F, Albanese P, Biasiolo A, Pegoraro C, Iliceto S, et al.: **Thromboembolic Pulmonary Hypertension Study Group. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism.** *N Engl J Med* 2004, **350**:2257-2264.
- Fadel E, Riou JY, Mazmanian M, Brenot P, Dulmet E, Detruit H, Serraf A, Bacha EA, Herve P, Dartevelle P: **Pulmonary thromboendarterectomy for chronic thromboembolic obstruction of the pulmonary artery in piglets.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999, **117**:787-793.
- Fadel E, Michel RP, Eddahibi S, Bernatchez R, Mazmanian GM, Baudet B, Dartevelle P, Herve P: **Regression of postobstructive vasculopathy after revascularization of chronically obstructed pulmonary artery.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004, **127**:1009-1017.
- Fadel E, Mazmanian GM, Chapelier A, Baudet B, Detruit H, de Montpreville V, Libert JM, Wartski M, Herve P, Dartevelle P: **Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **157**:1294-1300.
- Hall AV, Jevnikar AM: **Significance of endothelial cell survival programs for renal transplantation.** *Am J Kidney Dis* 2003, **41**:1140-1154.
- Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ: **Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism.** *Transplantation* 1999, **68**:89-96.
- Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, Liu M, Keshavjee S: **Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation.** *Ann Surg* 2000, **231**:424-431.
- Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S: **Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**:1932-1939.
- Fadel E, Mazmanian GM, Baudet B, Detruit H, Verhoye JP, Cron J, Fattal S, Dartevelle P, Herve P: **Endothelial nitric oxide synthase function in pig lung after chronic pulmonary artery obstruction.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**:1429-1434.
- Reignier J, Mazmanian M, Detruit H, Chapelier A, Weiss M, Libert JM, Herve P: **Reduction of ischemia-reperfusion injury by pentoxifylline in the isolated rat lung. Paris-Sud University Lung Transplantation Group.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **150**:342-7.
- Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P: **Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors.** *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**:356-370.
- Kuwano K, Hara N: **Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, **22**:147-149.
- Sliwa K, Woodiwiss A, Kone VN, Candy G, Badenhorst D, Norton G, Zambakides C, Peters F, Essop R: **Therapy of ischemic cardiomyopathy with the immunomodulating agent pentoxifylline: results of a randomized study.** *Circulation* 2004, **109**:750-5.
- Jamieson SW, Kapelanski DP, Sakakibara N, Manecke GR, Thistlethwaite PA, Kerr KM, Channick RN, Fedullo PF, Auger WR: **Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1,500 cases.** *Ann Thorac Surg* 2003, **76**:1457-1462.
- Dartevelle P, Fadel E, Chapelier A, Macchiarini P, Cerrina J, Parquin F, Simonneau F, Simonneau G: **Angioscopic video-assisted pulmonary endarterectomy for post-embolic pulmonary hypertension.** *Eur J Cardiothorac Surg* 1999, **16**:38-43.
- Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S: **Ischemia-reperfusion-induced lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:490-511.
- Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S: **Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation.** *Am J Transplant* 2005, **5**:292-9.
- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y: **Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor.** *Circulation* 1998, **97**:276-281.
- Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA: **Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation.** *J Clin Invest* 1999, **104**:541-549.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



DEUXIÈME ÉTUDE

**Régression de la vasculopathie pulmonaire d'hyper-débit après
correction du débit pulmonaire chez le porc**

**Regression of flow-induced pulmonary arterial vasculopathy after
flow correction in piglets**

Olaf Mercier, Edouard Sage, Marc de Perrot, Ly Tu, Elisabeth Marcos, Benoît Decante,
Bruno Baudet, Philippe Hervé, Philippe Dartevelle, Saadia Eddahibi et Elie Fadel

J Thorac Cardiovasc Surg 2009;137:1538-1546

Nous avons voulu, dans ce travail, modéliser les territoires vasculaires pulmonaires non obstrués de l'HTPPE avant et après TEP. Il est établi que l'hyper-débit pulmonaire provoque une vasculopathie pulmonaire distale avec épaissement de la média des artérioles similaire à celle de l'HTP (14). Ce type de lésion vasculaire pulmonaire distale est retrouvé en prédominance dans les territoires vasculaires non obstrués de l'HTPPE (98) soumis à un hyper-débit relatif par redistribution du débit cardiaque. Nous avons utilisé un modèle animal qui consiste à créer une fistule prothétique aorto-pulmonaire, reproduisant ainsi les lésions vasculaires distales par hyper-débit (99). Une fois les lésions vasculaires établies, la fermeture du shunt reproduit les conditions rencontrées après TEP dans ces territoires perfusés.

La connaissance de la biologie de l'HTP s'est considérablement améliorée ces dix dernières années. L'endothéline, le NO et l'angiopoïétine sont autant de facteurs impliqués dans le remodelage vasculaire pulmonaire de l'HTAP (100-102). Nous avons émis l'hypothèse que ces facteurs étaient impliqués dans la formation et la régression de la vasculopathie pulmonaire d'hyper-débit.

Nous avons comparé trois groupes de 10 cochons recevant 5 semaines de shunt aorto-pulmonaire. Le premier groupe était immédiatement étudié, le deuxième groupe était étudié après une semaine de fermeture du shunt et le troisième groupe après 5 semaines d'arrêt du shunt. Ces trois groupes étaient comparés à un groupe Sham dont l'artère pulmonaire a simplement été disséquée.

1. Résultats

a. Hémodynamique

Le shunt aorto-pulmonaire augmente le débit cardiaque et le débit pulmonaire lorsqu'il est ouvert. On note une augmentation significative de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) shunt ouvert avec un retour à la normale dès la fermeture du shunt 5 semaines plus tard.

b. Morphométrie

L'épaisseur de la média était calculée pour les artérioles pulmonaires distales de moins de 200 microns de diamètre externe. Après 5 semaines de shunt aorto-pulmonaire, il existe un épaissement significatif de la média des artérioles pulmonaires qui diminue

progressivement après la fermeture du shunt sans toutefois atteindre les valeurs du groupe Sham après 5 semaines de fermeture.

L'immunomarquage du PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) montre qu'il existe une coloration des noyaux des cellules musculaires lisses de la média des artérioles pulmonaires dans le groupe shunt ouvert.

L'immunomarquage selon la méthode TUNEL montre une coloration des noyaux des cellules musculaires lisses de la média des artérioles pulmonaires dans les deux groupes au shunt fermé.

La coloration au trichrome de Masson ne met pas en évidence d'accumulation de collagène dans la média des artérioles pulmonaires des différents groupes.

c. Vaso-réactivité des anneaux d'artère pulmonaire

La relaxation maximale à l'Acétylcholine était significativement moins importante shunt ouvert et à une semaine de fermeture alors qu'elle revient au niveau du groupe Sham, 5 semaines après la fermeture.

La contraction maximale à l'endothéline-1 est identique shunt ouvert, 1 semaine après la fermeture ou dans le groupe Sham. En revanche, 5 semaines après la fermeture du shunt, la contraction maximale à l'endothéline-1 est significativement moins importante.

Les contractions ou relaxations non endothélium dépendantes sont identiques entre les différents groupes.

d. Expression des gènes des voies ET-1, NOS et Angiopoïétine au sein du parenchyme pulmonaire

Le shunt aorto-pulmonaire provoque une expression accrue de NOSe, ET-1, ETA, Ang-1, Ang-2 et Tie2. Une semaine après fermeture du shunt, le niveau d'expression de ces différents gènes retourne à des valeurs similaires au groupe Sham.

5 semaines après la fermeture du shunt, seule l'expression d'ETB est augmentée de manière significative. Le niveau d'expression des autres gènes reste équivalent à celui du groupe Sham.

e. Expression des protéines des voies ET-1, NOS et Angiopoïétine au sein du parenchyme pulmonaire

Les résultats concernant le niveau d'expression protéique au sein des poumons des groupes étudiés sont en accord avec les résultats de leur expression génique sauf pour la NOSe. En effet, l'expression protéique étudiée par Western Blot de NOSe ne varie pas en fonction des groupes.

f. Étude de l'activité de la Phosphodiesterase 5 (PDE5)

Le fait que la relaxation endothélium dépendante soit altérée en cas de shunt ouvert alors que l'expression génique de NOSe était augmentée, nous a poussés à explorer l'activité de PDE5. En effet, PDE5 est une enzyme qui dégrade le GMPc produit grâce au NO pour relaxer la cellule musculaire lisse vasculaire.

L'activité PDE5 n'est pas différente entre les trois groupes.

2. Conclusion

Les résultats de cette étude montrent que 5 semaines de shunt aorto-pulmonaire chez le porc induisait une vasculopathie pulmonaire distale se manifestant par un épaissement de la média des artérioles pulmonaires distales avec prolifération des cellules musculaires lisses, une vaso-relaxation endothélium dépendante altérée et une expression accrue des gènes ET-1, ETA, Ang-1, Ang-2 et Tie2 dans le parenchyme pulmonaire. La normalisation de l'expression de ces gènes précède celle de la vaso-réactivité endothélium dépendante et du remodelage vasculaire pulmonaire.

L'augmentation de l'expression de l'ARNm de ETB, 5 semaines après la fermeture du shunt souligne son rôle bénéfique potentiel dans la régression de l'épaississement de la média des artérioles pulmonaires. Les voies endothéline et angiopoïétine sont donc directement impliquées dans la formation de la vasculopathie distale des territoires vasculaires pulmonaires en hyper-débit et pourraient être des cibles thérapeutiques efficaces.

Regression of flow-induced pulmonary arterial vasculopathy after flow correction in piglets

Olaf Mercier, MD, Edouard Sage, MD, Marc de Perrot, MD, Ly Tu, BSc, Elisabeth Marcos, BSc, Benoît Decante, MSc, Bruno Baudet, BSc, Philippe Hervé, MD, Philippe Dartevelle, MD, Saadia Eddahibi, PhD, and Elie Fadel, MD

Objectives: Chronic thromboembolic pulmonary hypertension is due to partial obstruction of the pulmonary arterial bed and may resolve after pulmonary thromboendarterectomy. Persistent pulmonary hypertension, the main complication after pulmonary thromboendarterectomy, may reflect vessel alterations induced by high flow in unobstructed lung territories. The aim of this study was to determine whether correcting high flow led to reversal of the vasculopathy in piglets.

Methods: The effects of high pulmonary blood flow were investigated 5 weeks after creation of an aortopulmonary shunt ($n = 10$), and reversibility of vessel disease was evaluated at 1 week ($n = 10$) and 5 weeks after shunt closure ($n = 10$), compared to sham-operated animals ($n = 10$). Hemodynamic variables, pulmonary artery reactivity, and morphometry were recorded. We also investigated the endothelin, angiotensin, and nitric oxide synthase pathways.

Results: High flow increased medial thickness in distal pulmonary arteries ($55.6\% \pm 1.2\%$ vs $35.9\% \pm 0.8\%$; $P < .0001$) owing to an increase of smooth muscle cell proliferation (proliferating cell nuclear antigen labeling). The endothelium-dependent relaxation was altered ($P < .05$). This phenomenon was associated to an overexpression of endothelin-1, endothelin-A, angiotensin 1, angiotensin 2, and Tie-2 ($P < .05$). After 1 week of shunt closure, all overexpressed genes returned to control values, the proliferation of smooth muscle cells stopped, and smooth muscle cell apoptosis increased (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), preceding the normalization of the wall thickness hypertrophy and the pulmonary artery vasoreactivity observed at 5 weeks after shunt closure.

Conclusion: These results demonstrate that endothelin-1 and angiotensin pathways are involved in vasculopathy development and may be important therapeutic targets for preventing persistent pulmonary hypertension after pulmonary thromboendarterectomy.

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is a life-threatening disease with an overall 5-year survival of 10% in patients whose mean pulmonary artery (PA) pressure exceeds 50 mm Hg.¹ CTEPH is more common than previously thought and may occur in up to 3.8% of patients with acute pulmonary embolism.² Organized thrombotic material causing chronic vascular obstruction is the pathogenic mechanism, and pulmonary thromboendarterectomy (PTE) provides long-term hemodynamic and functional benefits and increases life expectancy.³⁻⁵ However, PTE is associated with 5% to 23% mortality, related chiefly to reperfusion pulmonary edema and persistent pulmonary hypertension (PH) despite removal of the thrombotic material.³⁻⁵

Two vascular territories can be distinguished in the lung after pulmonary thromboembolism: the obstructed territory characterized by chronic ischemia and the unobstructed territory exposed to chronic high blood flow resulting from redistribution of the cardiac output.^{6,7} This unobstructed territory contributes to the elevated pulmonary vascular resistance,⁸ inasmuch as chronic high flow causes distal arteriopathy with vascular remodeling^{9,10} similar to that found in primary PH.¹¹⁻¹⁵

Pulmonary thromboendarterectomy in patients with high pulmonary vascular resistance is associated with high rates of mortality and postoperative persistent PH. Preoperative prostacyclin infusion, which induces PA vasodilatation and inhibits vascular remodeling, has been found to decrease post-PTE mortality in patients with preoperative pulmonary resistance values exceeding 1200 dyne \cdot s \cdot cm⁵.¹⁶ These findings support the hypothesis that the distal arteriopathy induced by chronic high blood flow in unobstructed territories may be the cause of persistent PH after PTE.

Knowledge of the pathobiological mechanisms underlying PH has significantly improved over the past decade. Three pathways seem to play a key role in the development of PH: endothelin, angiotensin, and nitric oxide synthase (NOS).¹⁷⁻¹⁹ The endothelial dysfunction seen in PH is associated with an imbalance between endothelium-derived

From the Laboratoire de Chirurgie Expérimentale UPRES-EA 2705, Université Paris XI Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

This work was supported by a grant from ADETEC, France.

Received for publication Feb 10, 2008; revisions received June 23, 2008; accepted for publication July 26, 2008.

Address for reprints: Olaf Mercier, MD, Laboratoire de Chirurgie Expérimentale UPRES-EA 2705, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France (E-mail: o.mercier@cml.fr).

J Thorac Cardiovasc Surg 2009;137:1538-46

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2009 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2008.07.069

Abbreviations and Acronyms

CTEPH	= chronic thromboembolic pulmonary hypertension
eNOS	= endothelial nitric oxide synthase
ET	= endothelin
iNOS	= inducible nitric oxide synthase
NOS	= nitric oxide synthase
PA	= pulmonary artery
PBS	= phosphate-buffered saline
PCNA	= proliferating cell nuclear antigen
PH	= pulmonary hypertension
PTE	= pulmonary thromboendarterectomy
SMC	= smooth muscle cell
TUNEL	= terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling

vasoconstrictor/mitogenic factors and vasodilator/nonmitogenic factors. However, few studies to understand mechanisms underlying CTEPH had been published. Angiopoietin-1 expression was found to be increased in patients with CTEPH, as in various other forms of PH.¹⁹

We studied the effects of chronic high blood flow to the lungs in an experimental animal model of aortopulmonary shunting. We determined whether the effects of high pulmonary blood flow resolved after restoring normal blood flow to simulate the effects of PTE. We analyzed nitric oxide, endothelin, and angiopoietin pathways to understand pathophysiological mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Forty Large White piglets weighing 21 ± 3 kg were used. The study complied with the "Principles of Laboratory Animal Care," developed by the National Society for Medical Research, and the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals," written by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (publication No.86-23, revised in 1985).

Experimental Design

The piglets were randomly allocated to four groups ($n = 10$ in each group). The studies were done 5 weeks after performing an aortopulmonary shunt to increase blood flow into PAs (shunt-open group), 1 week (1-week shunt-closed group) and 5 weeks (5-week shunt-closed group) after closure of this shunt, and 5 weeks after PA dissection without shunt in the sham group.

Surgical Procedures

Aortopulmonary shunt. An aortopulmonary shunt was performed as previously described by Rendas, Lennox, and Reid.²⁰ An 8-mm diameter polytetrafluoroethylene bypass was implanted between the ascending aorta and the main PA. Fractionated heparin was given until harvesting of the lungs or closure of the shunt to avoid postoperative occlusion of the shunt.

Aortopulmonary shunt closure. The midline sternotomy was reopened. After systemic heparinization, the aorta and main PA were partially clamped on each side of the bypass, which was divided and sutured.

Hemodynamic Measurements and Lung Harvesting

Pulmonary hemodynamics were measured before the animals were killed. Aortic blood flow was measured with a flow probe (Transonic Systems, Inc, Ithaca, NY) placed on the origin of the aorta upstream from the aortopulmonary shunt. The pulmonary and systemic flow values were measured downstream from the shunt.

Pressures and blood gases were measured by direct puncture downstream from the aortopulmonary shunt. Then, the animal was exsanguinated and the lungs rapidly removed from the chest. Patency of the shunt was assessed by direct visual inspection. Biopsy specimens weighing 300 to 500 mg from the left upper lobe were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C or left to fix in 4% paraformaldehyde solution.

Light Microscopy and Morphometry

Fixed lung sections were processed by standard histologic techniques and embedded in paraffin. We sought to identify 30 to 40 arteries of less than 200 μm in diameter in each piglet. Medial thickness (MT) was calculated as follows:

$$\%MT = (ED - ID) \times 100/ED$$

Where ED = external diameter and ID = internal diameter.

Evaluation of In Situ PA-Smooth Muscle Cell (SMC) Death and Proliferation and Collagen Accumulation

To assess the PA-SMC proliferation, we evaluated the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Tissue sections were deparaffinized in xylene, followed by treatment with a graded series of alcohol washes, rehydration in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.5), and then incubated with target retrieval solution (Dako, Trappes, France) into a water bath at 90°C for 20 minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked with H_2O_2 in PBS (3% vol/vol) for 5 minutes. Slides were then washed in PBS and incubated for 30 minutes in a protein-blocking solution consisting of PBS supplemented with 3% bovine serum albumin. The slides were subsequently incubated for 30 minutes with anti-PCNA mouse monoclonal antibody (PC-10, 1:200, Dako, Trappes, France). Antibodies were washed off and the slides were processed with the alkaline phosphatase LSAB+ system-HRP detection kit (DAKO, Carpinteria, Calif). Brown color was generated by using a diaminobenzidine substrate and nuclei were counterstained with hematoxylin.

Detection of cells undergoing apoptosis was evaluated by the ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Qbiogene, Illkirch, France), as specified by the manufacturer.

So that collagen accumulation could be assessed, the paraffin-embedded sections were deparaffinized and stained with Masson trichrome stain.

Assessment of PA reactivity

Pulmonary artery rings were studied as previously described.²¹ Endothelin-1 (ET-1), sodium nitroprusside, acetylcholine hydrochloride, and indomethacin were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, Mo).

Real-Time Quantification by Polymerase Chain Reaction Assay

Real-time polymerase chain reaction assay was conducted as previously described.¹² Except for the report gene 18S, angiopoietins, and Tie-2, all the primers (ET-1, ETA, ETB, endothelial NOS [eNOS], inducible NOS [iNOS]) were specific porcine primers previously described by Rondelet and associates.¹² Primers for 18S ribonucleic acid, angiopoietins and Tie-2 had been used previously in our laboratory for human experimentation and were designed on Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, Calif).

Assay of Lung Phosphodiesterase 5 Activity

Phosphodiesterase 5 assays were carried out from frozen lung tissue according to established procedures.²²

TABLE 1. Changes in hemodynamic variables and blood gas levels induced by opening and by closing an aortopulmonary shunt

	Sham	Shunt open	Shunt closed	
			One week	Five weeks
Weight (kg)	24 ± 4	28 ± 3	46 ± 8	40 ± 6
HR (beats/min)	98 ± 4	89 ± 3	89 ± 9	89 ± 9
Q (L · min ⁻¹)	2 ± 0.14	3.3 ± 0.3*	2.14 ± 0.6‡	2.2 ± 0.27‡
Mean SAP (mm Hg)	55 ± 3	51 ± 4	51 ± 3	57 ± 4
Mean PAP (mm Hg)	10.1 ± 0.5	15.7 ± 1.2*	10.2 ± 2‡	10.2 ± 1.2‡
PaO ₂ (mm Hg)	336.65 ± 18	262 ± 19*	282 ± 36	367 ± 20‡
PA Po ₂ (mm Hg)	41.7 ± 2.6	47.2 ± 2.7	38.5 ± 3‡	36.5 ± 1.6‡

HR, Heart rate; Q, cardiac outflow; SAP, systemic arterial pressure; PAP, pulmonary arterial pressure; PaO₂, systemic Po₂; PA Po₂, pulmonary artery Po₂. **P* < .05 sham group vs shunt-open group. †*P* < .05 shunt-open group vs 5-week shunt-closed group. ‡*P* < .05 shunt-open group vs 1-week shunt-closed group.

Statistical Analysis

All results are reported as means ± SEM. The Kolmogorov–Smirnov test was applied to test for normality of the distribution of each variable. One-way analysis of covariance was performed using the weight of the piglets as the covariate, followed by Fisher's test for between-group comparisons. All statistical analyses were performed using Statview IV software (Abacus Concepts, Berkeley, Calif).

RESULTS

Effect of the Aortopulmonary Shunt on Hemodynamic Variables

None of the piglets died during or after the surgical procedures. The animals in the shunt-closed groups were kept longer than animals in the other two groups and therefore had a greater mean weight gain. Aortography performed before the animals were killed showed that the shunt was patent in piglets from the shunt-open group and occluded in piglets from the shunt-closed groups. As summarized in Table 1, cardiac output and mean PA pressure were elevated in the shunt-open group. Heart rate and mean arterial pressure were not significantly changed after 5 weeks of shunting. Cardiac output and mean PA pressure returned to sham values 1 and 5 weeks after shunt closure, and no changes were found in heart rate and mean arterial pressure. As expected PA Po₂ was increased in the shunt-open group compared with the sham group; PA Po₂ in the shunt-closed groups was not significantly different from that in the sham group. The pulmonary/systemic flow values were similar in the shunt-open groups.

Pulmonary Vascular Remodeling

In the sham group, medial wall thickness of PAs less than 200 μm in diameter was 35.9% ± 0.8%. Five weeks after shunt creation, distal vascular remodeling was visible as a significant increase in medial wall thickness when compared with sham values (55.6% ± 1.2% vs 35.9% ± 0.8%; *P* < .001). Decrease in distal medial thickness followed closure of the shunt at 1 week (50% ± 1.4% vs 55.6% ± 1.2%; *P* = .062) and 5 weeks (40.9% ± 1% vs 55.6% ± 1.2%; *P* < .001), respectively. Medial thickness values returned to near sham values after 5 weeks of closure of the shunt (Figures 1A and 1B).

Proliferating cell nuclear antigen labeling demonstrated a proliferation of SMCs in the distal PA wall in shunted animals. As early as 1 week after shunt closure, the number of PCNA-positive cells decreased markedly and returned to sham values (22.4% ± 15% vs 6% ± 9%; *P* < .05). Conversely, the number of apoptotic cells as detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) in PA walls in the shunted group was similar to that in the sham group (6.6% ± 6% vs 9.2% ± 10%; *P* = not significant), peaked at 1 week after the shunt closure, and then returned toward sham values at 5 weeks after shunt removal (23.1% ± 18% vs 9.5% ± 9%; *P* < .05). Collagen accumulation around the PAs was not different between groups (Figures 2A and 2B).

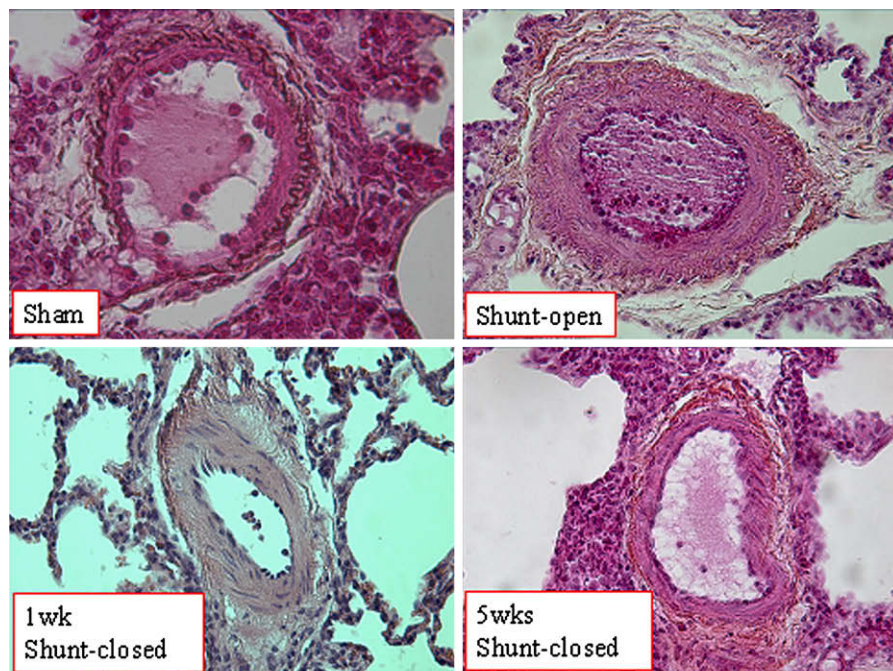
Pulmonary Vascular Reactivity and Endothelial Function (Figure 3)

Contraction of PA rings in response to phenylephrine was not significantly different in the four groups. Incubation of arteries with increasing doses of ET-1 induced dose-dependent contraction that was similar in the shunt-open, 1-week shunt-closed, and sham groups. In the 5-week shunt-closed group, however, maximal contraction induced by ET-1 was significantly lower than in the sham group (1722 mg vs 2380 mg; *P* = .019), although median effective concentration values were not significantly different.

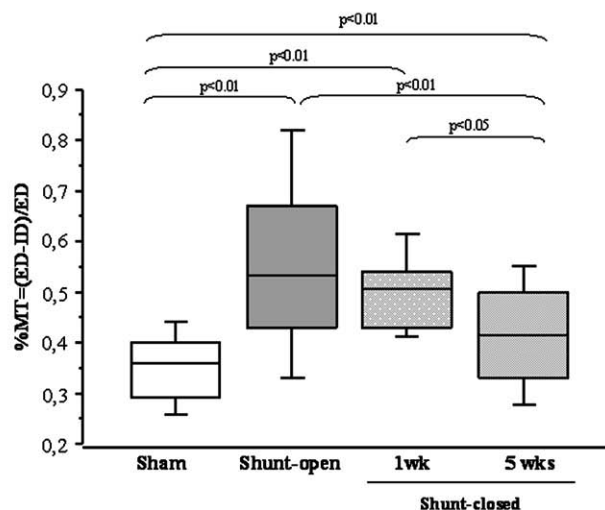
The relaxation response to sodium nitroprusside was not affected by aortopulmonary shunt creation or occlusion. Aortopulmonary shunting was followed by a decrease in maximal relaxation to acetylcholine (51.9% ± 5.42% vs 66.8% ± 6.6%; *P* = .045). Maximal relaxation to acetylcholine was not restored 1 week after closure of the shunt (52.1% ± 4.62% vs 51.9% ± 5.42%; *P* = .97) but returned to normal values at 5 weeks (67.6% ± 5.4% vs 66.8% ± 6.6%; *P* = .93). Median effective concentration values were unchanged.

Expression of Genes Involved in the ET-1, NOS, and Angiopoietin-1 Pathways

Increased lung blood flow induced an increase in ET-1, ETA, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie-2 mRNA



A



B

FIGURE 1. A, Morphometry ($\times 400$) of pulmonary arteries of less than $150\text{-}\mu\text{m}$ diameter in the sham group, the shunt-open group, and the shunt-closed groups. The percentage of medial thickness was the highest in the shunt-open group ($P < .05$). Medial thickness started to decrease after 1 week of shunt closure and raised a decrease of 75% after 5 weeks of shunt closure ($P < .001$). B, Box plot of the percentage of medial thickness of small pulmonary arteries ($<150\ \mu\text{m}$) in the sham ($35.9\% \pm 0.8\%$), shunt-open ($55.6\% \pm 1.2\%$), 1-week shunt-closed ($48.7\% \pm 1\%$), and 5-week shunt-closed ($40.9\% \pm 1\%$) groups. *MT*, Medial thickness; *ED*, external diameter; *ID*, internal diameter.

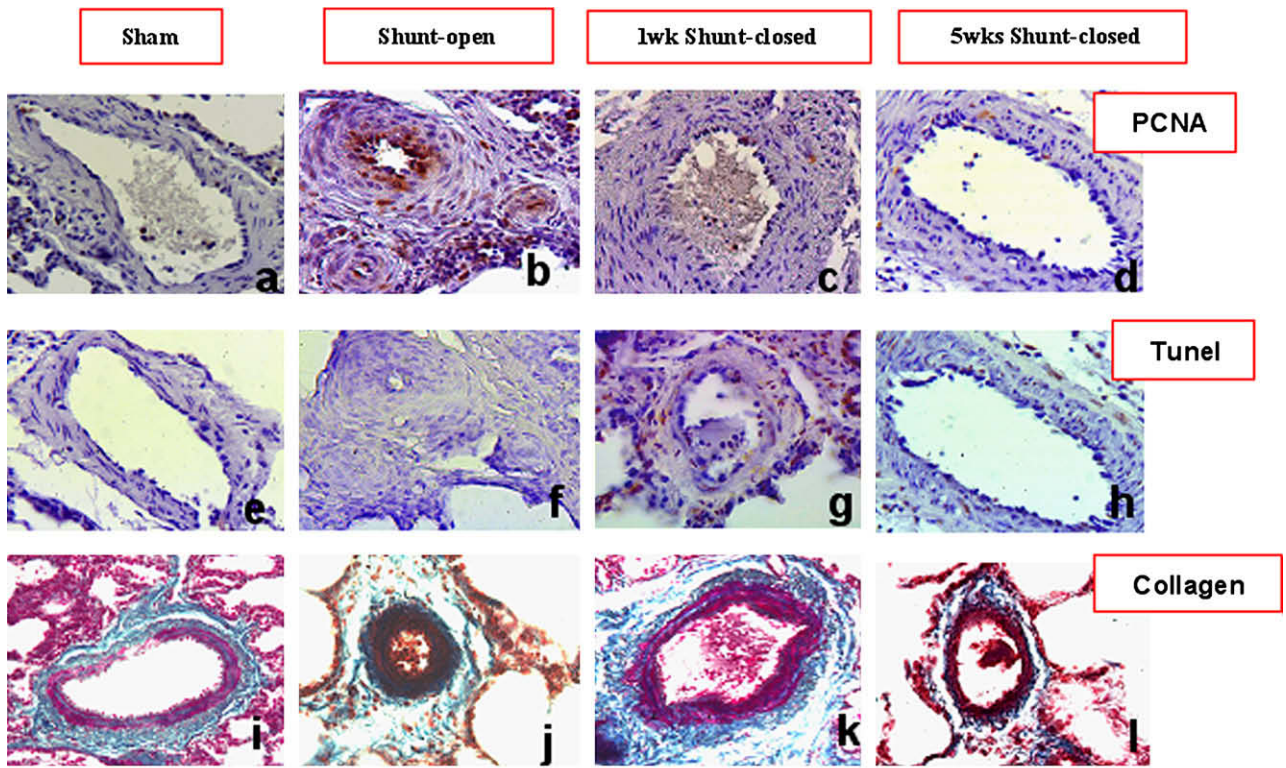
levels, without changes in steady-state levels of ETB or iNOS (Figures 4 and 5). For eNOS, mRNA levels were higher in the shunt-open group than in the sham group, whereas protein contents in lung tissue were not different (data not shown).

One week after shunt closure, ET-1, ETA, angiotensin-1, angiotensin-2, and Tie-2 mRNA levels returned to normal values. The normalization of morphometric parameters as seen 5 weeks after the shunt closure was preceded by a decrease of all overexpressed gene mRNA.

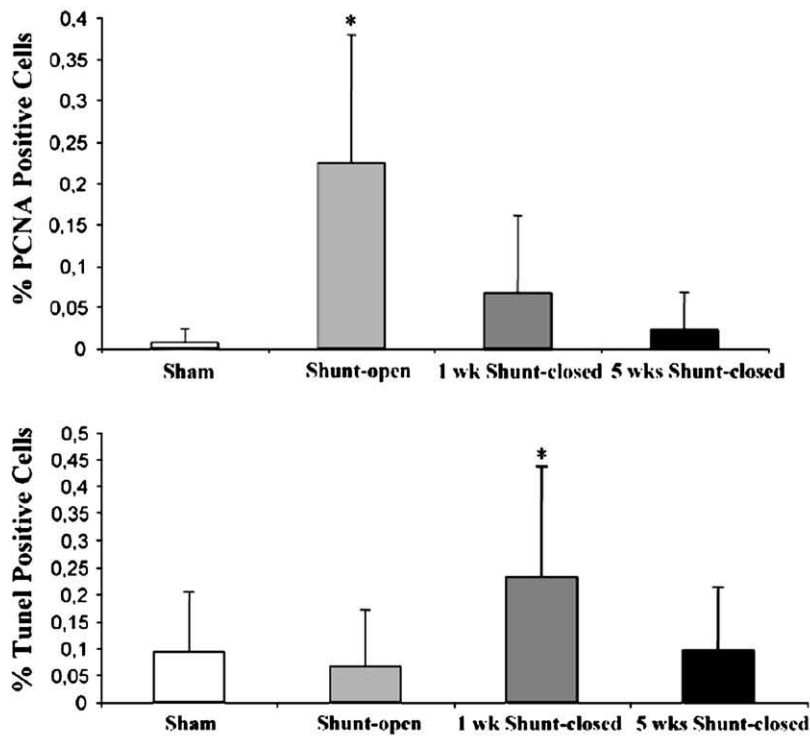
Five weeks after closure of the aortopulmonary shunt, we observed an increase of ETB mRNA levels and a paradoxical increase of normalized ET-1 mRNA levels (Figure 4).

Phosphodiesterase 5 Activity

To determine whether the decrease in endothelium-dependent relaxation was related to an increase in phosphodiesterase 5 activity induced by high blood flow, we measured phosphodiesterase 5 activity in lung tissue from piglets in all



A



B

* p<0,05

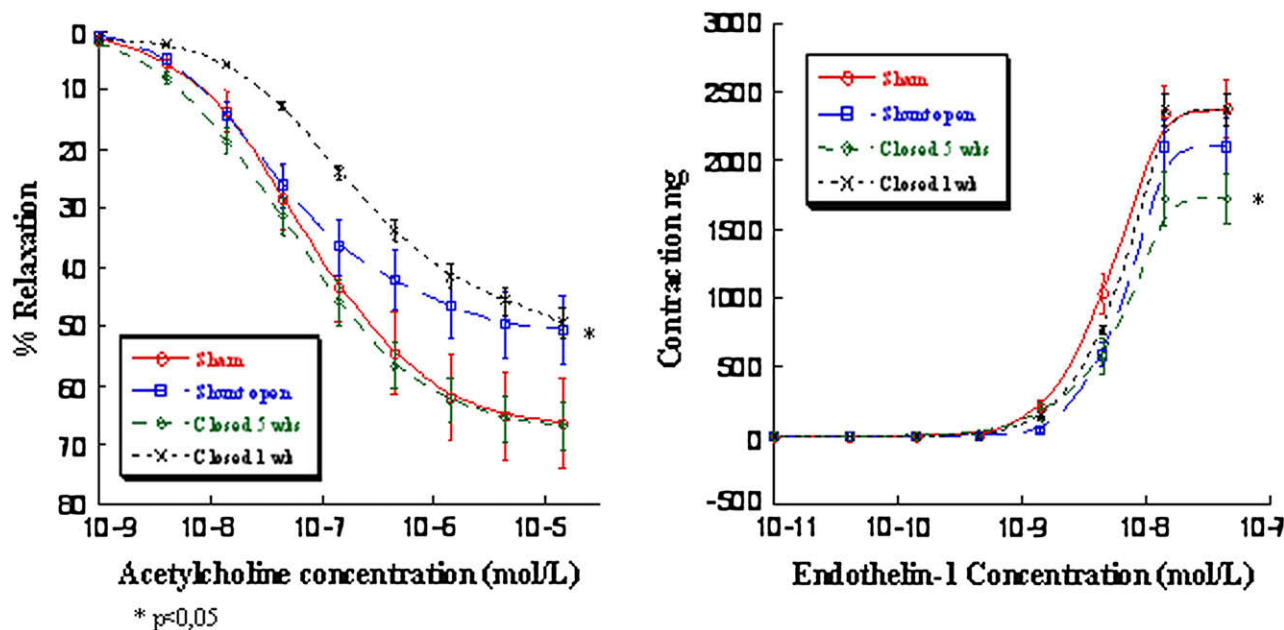


FIGURE 3. Vasoconstriction to endothelin-1 and relaxation to acetylcholine of PA rings from the sham group, the shunt-open group, and the shunt-closed groups. Aortopulmonary shunting induced a decrease in maximal relaxation to acetylcholine ($51.9\% \pm 5.42\%$ vs $66.8\% \pm 6.6\%$; $P = .045$). Five-week shunt closure was associated with recovery of the maximal relaxation to acetylcholine ($67.6\% \pm 5.4\%$ vs $66.8\% \pm 6.6\%$; $P = .93$), whereas it remains unchanged 1 week after shunt closure. In the 5-weeks shunt-closed group, ET-1-induced maximal contraction was lower than in the sham group (1722 mg vs 2380 mg, $P = .019$). PA, Pulmonary artery; ET-1, endothelin-1.

groups. Phosphodiesterase 5 activity was not affected by creation or closure of the shunt (data not shown).

DISCUSSION

This study showed that 5 weeks of aortopulmonary shunting induced pulmonary vasculopathy manifesting as medial thickness of the distal PAs owing to SMC proliferation, impaired endothelium-dependent vasorelaxation, and increase of ET-1, ETA, angiotensin-1, angiotensin-2, and Tie-2 expression in lung parenchyma. This study also demonstrates for the first time that after shunt closure, in the early phase (1 week), we observed a normalization of gene expression and later (5 weeks) a decrease of distal PA medial thickness, a normalization of endothelium-dependent vasorelaxation, and an increase of ETB expression.

After pulmonary embolism, the unobstructed lung territory is exposed to chronic high blood flow owing to redistribution of the cardiac output.^{6,7} This overflow induces

a progressive increase of PA pressure and shear stress owing to a distal PA vasculopathy. We also speculate that the long-term improvement in pulmonary vascular resistance seen after PTE in humans may reflect resolution of flow-induced arterial disease. Similarly, in patients with severe CTEPH, extensive PA lesions induced by overflow may result in failure of PTE to lower pulmonary vascular resistance and, therefore, in increased postoperative morbidity and mortality.⁶⁻⁸ Our model of aortopulmonary shunting had been previously used as a model of lung disease associated with congenital heart disorder.¹² Because it was not associated with chronic ischemic lung territories, this model neglected the potential effect of these territories on the non-ischemic lung territories. However, this model adequately reproduces functional vascular changes seen in the unobstructed territories of patients with CTEPH. Indeed, as in humans, the aortopulmonary shunting induced a high pulmonary blood flow and increased PA pressure. To assess

FIGURE 2. A, Evaluation of in situ PA-SMCs death as assessed by TUNEL (e-h), PA-SMC proliferation by PCNA coloration (a-d), and collagen accumulation by Masson trichrome staining (i-l) in the shunt-open, 1-week shunt-closed, 5-week shunt-closed, and sham groups ($\times 400$). Positive cells in TUNEL and PCNA staining are colored in brown. Collagen is colored in blue by Masson trichrome staining. PA wall thickness in the shunt-open group is related to the proliferation of SMCs (b) without intravascular collagen accumulation (j). The decrease of PA medial thickness observed 5 weeks after the shunt closure started at 1 week with a decrease of PCNA-positive cells (c) and increased TUNEL-positive cells (g). PA, Pulmonary artery; SMC, smooth muscle cell; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling, PCNA, proliferating cell nuclear antigen. B, Percentage of PCNA- and TUNEL-positive cells in the wall of distal PAs for all groups of piglets. There is an SMC proliferation in the wall of distal PAs in the shunt-open group that stopped at the shunt closure. SMC apoptosis increased 1 week after the shunt closure and returned to normal value 5 weeks after the closure. PA, Pulmonary artery; SMC, smooth muscle cell; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling, PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

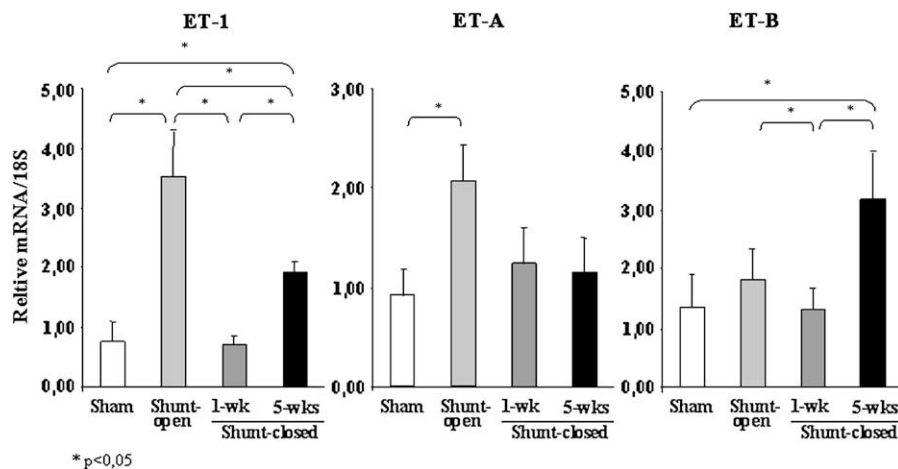


FIGURE 4. Quantification of endothelin-1 (*ET-1*) and its receptors (*ETA* and *ETB*) mRNAs in lung parenchyma by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. High flow in the lungs induced increases in *ET-1* and *ETA* mRNAs but did not change steady-state level of *ETB*. Shunt closure was followed by early (1 week) decrease in *ET-1* and *ETA* mRNA levels. *ETB* mRNA level increased secondarily 5 weeks after the shunt closure.

possible therapeutic targets to treat this overflow-induced vasculopathy, we first investigated the mechanism of changes in pulmonary vascular wall thickness after shunt establishment and closure.

In patients with CTEPH, Moser and Braunwald⁶ had already reported marked structural changes of chronic PH in the open PAs. This high flow–induced vasculopathy is due to high pressure and high shear stress related to the redistribution of the cardiac outflow toward the unobstructed PA bed.⁷ This distal vasculopathy contributes as well as the proximal occlusion of PAs to the elevated pulmonary vascular resistance. Indeed, in our animal model, the overflow pulmonary vasculopathy, as induced by 5-week aortopulmonary shunting, was associated with increased medial thickness of distal PAs related to SMC proliferation as showed by PCNA labeling. These findings are similar to the vascular remodeling reported in unobstructed territories of patients with CTEPH,⁶ suggesting thus that the overflow, with the increase of the shear stress that it induces, can be re-

sponsible for the vascular remodeling. This remodeling is then associated with the progressive increase of PA resistances. We also found that 1 week after PA flow normalization, the SMC proliferation decreased whereas apoptosis, as assessed by TUNEL, increased markedly. This imbalance between SMC proliferation and apoptosis was not associated with alteration of vascular collagen accumulation.

High blood flow in the lungs was associated with an increase in *ET-1* and *ETA* levels in lung tissue. *ET-1* is a potent vasoconstrictor and mitotic peptide for vascular SMCs. *ET-1* overexpression has been found in animal studies of flow-induced PH¹²⁻¹⁴ and in patients with primary PH.^{17,18} *ET-1* overproduction is probably a response to stimuli such as shear stress resulting from arterial pressure elevation.²³ One week after shunt closure, lung *ET-1* and *ETA* levels break, whereas PA remodeling still persists. However, 5 weeks after shunt closure, the normalization of PA wall thickness was associated with restoration of lung *ET-1* synthesis. These data suggest that *ET-1* may be involved in the

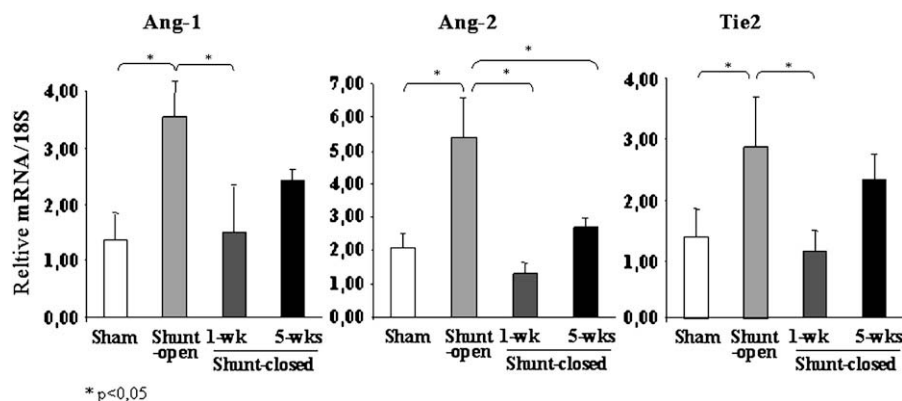


FIGURE 5. Quantification of angiotensin-1, angiotensin-2 and Tie-2 mRNA levels in the lung parenchyma from sham, shunt-open, and shunt-closed groups. High flow in the lungs induced an increase in angiotensin-1, angiotensin-2, and Tie-2 mRNA levels. Tie-2 mRNA level increased whereas the angiotensin-1/angiotensin-2 ratio remained the same. Shunt closure was followed by a decrease of expression of these genes.

development and resolution of flow-induced lung vessel disease.

Rondelet and associates¹² reported that ET-1 inhibition by the ETA/ETB antagonist bosentan prevented pulmonary vascular remodeling in a piglet model of high flow-induced pulmonary vasculopathy. Interestingly, in our model, when flow was returned to normal by closing the shunt, ETB overexpression in lung tissue occurred, whereas ETA expression returned to sham values. ETB is selectively found in the distal PA bed,²⁴ both on SMCs and on endothelial cells.²⁵ SMC ETB mediates the same signals as ETA, inducing vasoconstriction and mitosis. In contrast, endothelial ETB serves as a clearance receptor for ET-1 and modulates ET-1 expression via a negative feedback loop and via the release of vessel relaxants such as nitric oxide.²³ As the maximal contraction of PA ring induced by ET-1 was significantly lower in the 5-week shunt-closed group than in the sham group, ETB overexpression after shunt closure may reflect overexpression of the endothelial subtype rather than of the SMC subtype. ETB and ET-1 expressions follow the same evolution. This suggests that ETB may play a role in the control of ET-1 clearance and consequently may contribute to the regression of the distal arterial abnormalities induced by high flow.

In our study, eNOS RNA expression increased in the shunt-open group because of chronically increased shear stress, whereas endothelium-dependent relaxation of isolated pulmonary rings, which reflects nitric oxide production, was impaired. Of several studies investigating high-flow PH and eNOS expression,^{12,15,26-28} only one¹⁵ found increased eNOS protein levels; this increase was not found in lung homogenate but instead in fifth-generation isolated PA cells. In our model, the decrease in endothelium-dependent relaxation suggests that flow-induced PH may be related to alteration of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway. To investigate this possibility, we measured phosphodiesterase 5 activity in lung tissue from piglets with open aortopulmonary shunt. We found no change in phosphodiesterase 5 activity. Rondelet and associates²⁹ reported that the phosphodiesterase 5 inhibitor seldinafil induced a partial improvement in flow-induced PH in piglets. These results suggest that alteration of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway may result from deterioration in eNOS activity and/or in nitric oxide stability. After shunt closure, endothelium-dependent relaxation of isolated PA rings returned gradually to normal, indicating improved matching of nitric oxide production to the number of SMCs.

Angiopoietin-1 is a peptide that contributes to lung vessel development by recruiting and promoting the division of vascular SMCs.¹⁹ Angiopoietin-1 and Tie-2 overexpressions were found in lung parenchyma from patients with PH.¹⁹ Thus, angiopoietin-1 may contribute to the excessive muscularization of distal PAs that characterizes PH. In our study, angiopoietin-1 and Tie-2 expressions increased after

shunt opening and decreased after shunt closure. However, angiopoietin-2 expression followed angiopoietin-1 and Tie-2 expressions. Indeed, angiopoietin-2 blocks the angiopoietin-1/Tie-2 signal, resulting in a loosening of the tight vascular structure.³⁰ Although angiopoietin-2 expression increased in the shunt-open group and then decreased after the closure of the shunt, the rate angiopoietin-1/angiopoietin-2 remained the same in the four groups whereas Tie-2 was overexpressed in the shunt-open group and returned to normal in the shunt-closed groups. Thus, our results support that angiopoietin pathway may contribute to this vascular remodeling.

CONCLUSION

Flow-induced PA disease is associated with the increase of ET-1 and Tie-2 expressions in the lung parenchyma. Shunt closure to replicate the effects of PTE on nonobstructed lung territories was followed by normalization of ET-1 and Tie-2 expression and then gradually by resolution of the arterial abnormalities. These peptides hold promise as targets for treatments designed to improve PA disease in patients with CTEPH at risk of persistent PH after PTE.

References

- Riedel M, Stanek V, Widimsky J, Prerovsky I. Long-term follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data. *Chest*. 1982;81:151-8.
- Pengo V, Lensing AW, Prins MH, Marchiori A, Davidson BL, Tiozzo F, et al. Thromboembolic Pulmonary Hypertension Study Group. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 2004;350:2257-64.
- Jamieson SW, Kapelanski DP, Sakakibara N, Manecke GR, Thistlethwaite PA, Kerr KM, et al. Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1,500 cases. *Ann Thorac Surg*. 2003;76:1457-62.
- Dartevelle P, Fadel E, Chapelier A, Macchiarini P, Cerrina J, Parquin F, et al. Angioscopic video-assisted pulmonary endarterectomy for post-embolic pulmonary hypertension. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16:38-43.
- Hartz RS, Byrne JG, Levitsky S, Park J, Rich S. Predictors of mortality in pulmonary thromboendarterectomy. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:1255-9.
- Moser KM, Braunwald NS. Successful surgical intervention in severe chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 1973;64:29-35.
- Hoepfer MM, Mayer E, Simonneau G, Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006;113:2011-20.
- Peacock A, Simonneau G, Rubin L. Controversies, uncertainties and future research on the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:608-14.
- Moser KM, Bloor CM. Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 1993;103:685-92.
- Anderson EG, Simon G, Reid L. Primary and thromboembolic pulmonary hypertension: a quantitative pathological study. *J Pathol*. 1972;110:273-93.
- Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease: a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation*. 1958;18:533-47.
- Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, van Beneden R, Rummelink M, Brimiouille S, et al. Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2003;107:1329-35.
- Reddy VM, Wong J, Liddicoat JR, Johengen M, Chang R, Fineman JR. Altered endothelium-dependent responses in lambs with pulmonary hypertension and increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol*. 1996;271:H562-70.
- Ovadia B, Reinhartz O, Fitzgerald R, Bekker JM, Johengen MJ, Azakie A, et al. Alterations in ET-1, not nitric oxide, in 1-week-old lambs with increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H480-90.

15. Black SM, Fineman JR, Steinhorn RH, Bristow J, Soifer SJ. Increased endothelial NOS in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1998;275:H1643-51.
16. Nagaya N, Sasaki N, Ando M, Ogino H, Sakamaki F, Kyotani S, et al. Prostacyclin therapy before pulmonary thromboendarterectomy in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 2003;123:338-43.
17. Gaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993;328:1732-9.
18. Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81:542-54.
19. Thistlethwaite PA, Lee SH, Du LL, Wolf PL, Sullivan C, Pradhan S, et al. Human angiotensin II gene expression is a marker for severity of pulmonary hypertension in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122:65-73.
20. Rendas A, Lennox S, Reid L. Aorta-pulmonary shunts in growing pigs: functional and structural assessment of the changes in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1979;77:109-18.
21. Fadel E, Mazmanian GM, Baudet B, Detruit H, Verhoye JP, Cron J, et al. Endothelial nitric oxide synthase function in pig lung after chronic pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1429-34.
22. Appleman MM, Thompson WJ, Russell TR. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1973;3:65-98.
23. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004;61:227-37.
24. Black SM, Mata-Greenwood E, Dettman RW, Ovadia B, Fitzgerald RK, Reinhartz O, et al. Emergence of smooth muscle cell endothelin B-mediated vasoconstriction in lambs with experimental congenital heart disease and increased pulmonary blood flow. *Circulation*. 2003;108:1646-54.
25. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation*. 2002;105:1034-6.
26. Fike CD, Kaplowitz MR, Bousamra M 2nd. eNOS and prostanoid enzymes in lungs of newborn piglets with chronic aortopulmonary shunts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281:L475-82.
27. Parviz M, Bousamra M 2nd, Chammas JH, Birks EK, Presberg KW, Jacobs ER, et al. Effects of chronic pulmonary overcirculation on pulmonary vasomotor tone. *Ann Thorac Surg*. 1999;67:522-7.
28. Everett AD, Le Cras TD, Xue C, Johns RA. eNOS expression is not altered in pulmonary vascular remodeling due to increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol*. 1998;274:L1058-65.
29. Rondelet B, Kerbaul F, Van Beneden R, Motte S, Fesler P, Hubloue I, et al. Signaling molecules in overcirculation-induced pulmonary hypertension in piglets: effects of sildenafil therapy. *Circulation*. 2004;110:2220-5.
30. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997;277(5322):48-50.

TROISIÈME ÉTUDE

L'utilisation d'un antagoniste du récepteur ETA de l'endothéline-1 accélère la régression de la vasculopathie pulmonaire induite par l'hyper-débit chez le porc

Endothelin-A Receptor Blockade Improves Regression of Flow-induced Pulmonary Vasculopathy in Piglets

Olaf Mercier, Edouard Sage, Mohammed Izziki, Marc Humbert, Philippe Dartevelle, Saadia Eddahibi and Elie Fadel

J Thorac Cardiovasc Surg. 2010 Sep;140(3):677-83.

Les conclusions de notre deuxième étude nous ont amenés à voir l'endothéline-1 comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la vasculopathie pulmonaire distale induite par l'hyper-débit. Nous avons montré que l'arrêt de l'hyperdébit provoquait une régression progressive de cette vasculopathie sans toutefois atteindre les valeurs normales au bout de 5 semaines. Les lésions microvasculaires pulmonaires des patients atteints d'HTPPE grave avec des RPT élevées participeraient à la persistance de l'hypertension pulmonaire malgré une TEP anatomiquement satisfaisante (11). L'utilisation d'un médicament accélérant la régression de cette vasculopathie pourrait améliorer le résultat de la chirurgie dans certains cas particuliers (76). Les antagonistes de l'endothéline-1 sont couramment utilisés dans le traitement de l'HTP pour leur effet sur les résistances vasculaires pulmonaires (100). L'hypothèse testée dans ce travail est l'accélération de la régression de la vasculopathie pulmonaire d'hyper-débit par la prescription d'un antagoniste du récepteur A (ETA) de l'endothéline-1. Nous avons choisi un antagoniste sélectif de l'ETA car les résultats de l'étude précédente montraient une surexpression d'ETB après 5 semaines de fermeture du shunt soulignant son possible rôle bénéfique sur la régression de la vasculopathie.

3 groupes de 5 cochons sont comparés après 5 semaines de shunt aorto-pulmonaire. Le premier groupe est étudié après 5 semaines de shunt, le deuxième groupe est étudié après une semaine d'arrêt du shunt et le troisième groupe est étudié après une semaine d'arrêt du shunt entouré de 15 jours de traitement par un anti-ETA. Ces groupes sont comparés à un groupe Sham.

1. Résultats

a. Hémodynamique

Le groupe étudié shunt ouvert a un débit cardiaque plus élevé que les autres. Il n'y a pas de différence hémodynamique entre les groupes shunt fermé avec ou sans antagoniste de l'ETA.

b. Remodelage vasculaire pulmonaire

Il existe un épaissement de la média des artérioles pulmonaires de moins de 200 microns après 5 semaines de shunt aorto-pulmonaire. L'épaisseur de la média diminue une semaine après la fermeture du shunt mais reste bien supérieure aux valeurs du

groupe sham. Chez les animaux recevant l'antagoniste de l'ETA, l'épaisseur de la média des artérioles pulmonaires est identique à celle des animaux sham.

Avec ou sans traitement par antagoniste de l'ETA, la régression de l'épaisseur de la média se fait par arrêt de la prolifération des cellules musculaires lisses et augmentation de leur apoptose (immunomarquage par PCNA et TUNEL).

c. Expression des gènes des voies ET-1 et Angiopoïétine au sein du parenchyme pulmonaire

Nous avons confirmé ce que nous avons montré au cours de l'étude précédente. L'hyperdébit provoque une surexpression d'ET-1, ETA, Ang-1 et Tie2. L'expression de ces gènes se normalise une semaine après la fermeture du shunt. L'expression des gènes ETA, Ang-1 et Tie2 suit la même évolution dans le groupe traité par antagoniste de l'ETA, seule l'expression d'ET-1 reste plus élevée que la normale. Notre hypothèse est qu'il s'agit d'un feed-back négatif dû au traitement anti-endothéline.

2. Conclusion

Nous avons de nouveau montré que l'ET-1 et son récepteur ETA jouaient un rôle dans le développement d'une vasculopathie pulmonaire distale d'hyperdébit telle qu'on peut la voir dans les territoires non obstrués de l'HTPPE. Nous avons mis en évidence une normalisation de l'expression génique d'ET-1, ETA, Ang-1 et Tie2 associée à une régression incomplète du remodelage vasculaire pulmonaire une semaine après l'arrêt de l'hyperdébit. En ajoutant, à l'arrêt de l'hyperdébit, un traitement par un antagoniste de l'ETA, nous avons observé une accélération de la régression des lésions histologiques avec une normalisation de l'épaisseur de la média des artérioles pulmonaires de moins de 200 microns de diamètre. Un tel traitement pourrait avoir une utilité chez des patients atteints d'HTPPE avec des RPT élevées et une atteinte micro-vasculaire prédominante en préparation à la TEP. Cependant, nous n'explorons avec notre modèle qu'uniquement les territoires non obstrués sans inclure les modifications micro-vasculaires des territoires obstrués et l'éventuelle interaction entre ces deux territoires.

Endothelin A receptor blockade improves regression of flow-induced pulmonary vasculopathy in piglets

Olaf Mercier, MD,^a Edouard Sage, MD,^b Mohammed Izziki, PhD,^b Marc Humbert, MD, PhD,^b Philippe Dartevelle, MD,^b Saadia Eddahibi, PhD,^b and Elie Fadel, MD, PhD^b

Objectives: In patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension, high flow in unobstructed lung regions may induce small-vessel damage responsible for persistent pulmonary hypertension after pulmonary thromboendarterectomy. In piglets, closure of an experimental aortopulmonary shunt reverses the flow-induced vascular lesions and diminishes the elevated levels of messenger RNA (mRNA) expression for endothelin-1 and endothelin receptor A (ETA). We wanted to study the effect of the ETA antagonist TBC 3711 on reversal of flow-induced pulmonary vascular lesions.

Methods: Twenty piglets were studied. In 15 piglets, pulmonary vasculopathy was induced by creating an aortopulmonary shunt. After 5 weeks of shunting, some animals were studied ($n = 5$); others underwent shunt closure for 1 week with ($n = 5$) or without ($n = 5$) TBC3711 treatment. Anti-ETA treatment started 1 week before and ended 1 week after the shunt closure. The controls were sham-operated animals ($n = 5$).

Results: High blood flow led to medial hypertrophy of the distal pulmonary arteries ($54.9\% \pm 1.3\%$ vs $35.3\% \pm 0.9\%$; $P < .0001$) by stimulating smooth muscle cell proliferation (proliferating cell nuclear antigen) and increased the expression of endothelin-1, ETA or endothelin receptor type A or endothelin receptor A, angiotensin II, and Tie2 (real-time polymerase chain reaction). One week after shunt closure, gene expression levels were normal and smooth muscle cells showed increased apoptosis (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) without proliferation. However, pulmonary artery wall thickness returned to control values only in the group given TBC3711 ($33.2\% \pm 8\%$ with and $50.3\% \pm 1.3\%$ without; $P < .05$).

Conclusions: Anti-ETA therapy accelerated the reversal of flow-induced pulmonary arterial disease after flow correction. In patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension and severe distal pulmonary vasculopathy, anti-ETA agents may prove useful for preventing persistent pulmonary hypertension after pulmonary thromboendarterectomy. (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140:677-83)

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is due to partial obstruction of the pulmonary arterial tree by organized clots, which increase the pulmonary vascular resistance (PVR), leading to progressive pulmonary hypertension (PH) and right heart failure.¹ The main treatment is pulmonary thromboendarterectomy (PTE), which provides long-term hemodynamic and functional benefits and increases life expectancy.²⁻⁵ However, PTE is associated with a 10% mortality rate related chiefly to persistent PH despite removal of the thrombotic material.²⁻⁴ Persistent PH may reflect the existence of lesions in small precapillary vessels that are not accessible to surgery.⁶ Histopathologic studies show microvascular changes similar to those seen in idio-

pathic PH and Eisenmenger syndrome.⁷⁻⁹ These distal lesions in the unobstructed territories may contribute to the progression of the hemodynamic abnormalities and symptoms in the absence of further pulmonary embolism.^{10,11}

Compared with acute pulmonary embolism, CTEPH with a similar degree of vascular obstruction is associated with far higher PVR values as assessed by lung perfusion scanning.⁸ In patients with CTEPH, the unobstructed territories are chronically exposed to high blood flow owing to cardiac output redistribution.^{10,12} This high blood flow may contribute to increase the PVR,¹³ inasmuch as chronic high flow causes distal arteriopathy with vascular remodeling^{7,14} similar to that found in primary PH.¹⁵⁻¹⁹ As a result, alterations develop in the distal pulmonary arteries, adding to the PVR increase induced by the proximal occlusion. Greater severity of the microvascular disease is associated with higher PVR values, which in turn predict higher mortality after PTE.⁶ We have developed a piglet model of pulmonary vasculopathy induced by high blood flow to the lungs through an aortopulmonary shunt left open for 5 weeks. There was no chronic pulmonary artery obstruction in our model, which therefore does not provide any information about potential effects of chronically occluded territories on nonoccluded territories. However, our model replicates

From Inserm U999^a and Laboratoire de Chirurgie Expérimentale UPRES-EA 2705,^b Université Paris XI, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

This work was supported by a grant from Pneumologie Développement, France. Disclosures: None.

Received for publication Aug 24, 2009; revisions received Dec 6, 2009; accepted for publication Jan 1, 2010.

Address for reprints: Olaf Mercier, MD, Inserm U999, Hôpital Marie Lannelongue, 133 Avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France (E-mail: o.mercier@ccml.fr).

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2010 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2010.01.004

Abbreviations and Acronyms

Ang-1	=	angiotensin-1
CTEPH	=	chronic thromboembolic pulmonary hypertension
ET-1	=	endothelin-1
ETA	=	endothelin receptor type A
ETB	=	endothelin receptor type B
mRNA	=	messenger RNA
PA-SMC	=	pulmonary artery smooth muscle cell
PCNA	=	proliferating cell nuclear antigen
PH	=	pulmonary hypertension
PTE	=	pulmonary thromboendarterectomy
PVR	=	pulmonary vascular resistance
RT-PCR	=	real-time polymerase chain reaction
TUNEL	=	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling

the functional vascular changes seen in the nonoccluded territories of patients with CTEPH.²⁰ We²¹ previously reported that the shunt induced thickening of the media of small pulmonary arteries (<200 μm in diameter) and overexpression of endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor type A (ETA), angiotensin-1 (Ang-1), and Tie2. One week after shunt closure, we found normal expression of mRNAs for ET-1, ETA, Ang-1, and Tie2 and partial reversal of the medial hypertrophy.²¹ These data suggest that ET-1 and ETA may hold promise as therapeutic targets in patients with severe distal microvascular disease in unobstructed territories. Treatments targeting ET-1 have been used in other forms of PH. However, there is no evidence that ET-1 antagonist treatment given before PTE improves postoperative outcomes in patients with severe distal vascular changes.

The objective of this study was to evaluate the effects of the selective ETA antagonist TBC3711 on reversal of flow-induced pulmonary vasculopathy after shunt closure in our piglet model.

MATERIALS AND METHODS

We studied 20 Large White piglets weighing 21 ± 3 kg. The study complied with the National Institutes of Health "Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals" and was approved by the institutional committee on animal welfare.

Experimental Design

Twenty piglets were randomly allocated to 4 groups of 5. An aortopulmonary shunt was created in 3 groups to increase the blood flow to the pulmonary arteries. After 5 weeks of shunting, the animals in 1 of these groups were humanely killed (high-flow group) and those in the other 2 groups underwent shunt closure and then were humanely killed 1 week later. Of these 2 shunt-closure groups, 1 was untreated and killed 1 week after shunt closure (flow-correction group) and the other was treated with the selective ETA antagonist TBC3711 (flow-correction plus anti-ETA group),

which was started 1 week before shunt closure and continued until 1 week after shunt closure, when the animals were killed. The animals in the fourth group were killed 5 weeks after a sham operation consisting in dissection of the pulmonary artery (sham group).

Previous in vitro studies in humans and piglets have established that TBC3711 is a selective ETA antagonist.^{22,23} We used TBC3711 capsules in 2 daily oral doses of $11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 2 weeks.²³

Surgical Procedures

An aortopulmonary shunt was created and closed as previously described.²¹

Hemodynamic measurements and lung harvesting. Pulmonary hemodynamic variables, aortic blood flow, pressures, and blood gases were measured as previously described.²¹

Biopsy specimens weighing 300 to 500 mg were taken from the left upper lobe, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C or fixed in 4% paraformaldehyde solution.

Light microscopy and morphometry. Fixed lung sections were processed by standard histologic techniques and embedded in paraffin. We sought to identify 30 to 40 arteries measuring less than 200 μm in diameter in the lung specimens from each piglet. Media thickness (MT) was calculated as follows: $\%MT = (ED - ID/ED) \cdot 100$, where ED is the external diameter and ID the internal diameter.

In situ evaluation of smooth muscle cell death and proliferation and of collagen accumulation.

We evaluated the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) by labeling the proliferating cell nuclear antigen (PCNA).²¹ Cells undergoing apoptosis were detected with the ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Qbiogene, Illkirch, France). To assess collagen accumulation, we deparaffinized paraffin-embedded sections and stained them with Masson trichrome stain.

Real-time quantification by polymerase chain reaction

assay (RT-PCR). RT-PCR assays were conducted as previously described.¹⁶ The primers for ET-1, ETA, and endothelin receptor type B (ETB) were the specific porcine primers previously described by Rondelet and associates.¹⁶ For Ang-1, Tie2, and 18S RNA, we used primers designed on Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, Calif).

Statistical Analysis

All results are reported as means \pm standard error of the mean. The Kolmogorov-Smirnov test was used on each variable to determine whether the values were normally distributed. One-way analysis of covariance was performed using the weight of the piglets as the covariate, followed by Fisher's test for between-group comparisons. All statistical analyses were performed with Statview IV software (Abacus Concept, Berkeley, Calif).

RESULTS

The animals in the 2 flow-correction groups were kept 1 week longer than the animals in the high-flow and sham groups and, accordingly, exhibited higher mean weights when humanely killed (34 ± 5 kg and 40 ± 8 kg in the flow-correction groups with and without anti-ETA treatment, respectively, and 25 ± 3 kg and 27 ± 4 kg in the high-flow and sham groups, respectively).

Effect of the Aortopulmonary Shunt on Hemodynamic Variables

Compared with the sham-operated animals, animals in the high-flow group had higher values for cardiac output (3.4 ± 0.4 L/min vs 2.1 ± 0.16 L/min) and mean pulmonary artery

TABLE 1. Changes in hemodynamic variables

	Sham	High flow	Flow correction	Flow correction + anti-ETA
Weight (kg)	25 ± 3	27 ± 4	41 ± 7	34 ± 5
HR (beats/min)	95 ± 5	90 ± 2	90 ± 8	90 ± 16
Q (L/min)	2.1 ± 0.16	3.4 ± 0.4*	2.2 ± 0.6†	1.67 ± 0.2‡
Indexed Q (mL · min ⁻¹ · kg ⁻¹)	90 ± 26	118 ± 36*	45 ± 10‡	49 ± 14‡
mSAP (mm Hg)	56 ± 2	52 ± 4	50 ± 4	47.4 ± 6
mPAP (mm Hg)	10.2 ± 0.5	15.9 ± 1.2*	10.1 ± 2†	9 ± 3†

ETA, endothelin receptor type A; HR, heart rate; Q, cardiac output; mSAP, mean systemic arterial pressure; mPAP, mean pulmonary arterial pressure. *P < .05 vs sham group. †P < .05 vs high-flow group. ‡P < .05 vs sham and high-flow groups.

pressure (15.9 ± 1.2 mm Hg vs 10.2 ± 0.5 mm Hg; P < .05) (Table 1). In both flow-corrected groups, cardiac output and mean pulmonary artery pressure were similar and returned to sham values. Heart rate and mean systemic arterial pressure were similar in all groups.

Pulmonary Vascular Remodeling

Five weeks after shunt creation (high-flow group), media thickness of pulmonary arteries less than 200 μm in diameter was significantly greater than in the sham group (54.9% ± 1.3% vs 35.3% ± 0.9%; P < .001). One week after shunt closure alone (flow-correction group), media thickness was nonsignificantly decreased compared with the high-flow group (50.3% ± 1.3% vs 54.9% ± 1.3%; P = .062). When anti-ETA treatment was given, media thickness 1 week after shunt closure was not significantly different from the value in the sham group (33.2% ± 8% vs 35.3%

± 0.9%; P = not significant) (Figure 1). One week after shunt closure, media thickness had decreased significantly more in animals that received anti-ETA treatment (P = .001).

PCNA labeling showed PA-SMC proliferation in the distal arteries in the high-flow group (22.6% ± 14% vs 6.4% ± 9% in the sham group; P < .05), with a return to sham values 1 week after shunt closure. Conversely, the number of apoptotic cells detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) in pulmonary arterial walls was not significantly different between the high-flow group and the sham group (6.9% ± 5% vs 9.4% ± 10%; P = not significant) but was significantly higher in the flow-correction group than in the sham group (23.2% ± 16% vs 9.4% ± 10%; P < .05). Flow-correction plus anti-ETA treatment was associated with decreased PA-SMC proliferation (5.9% ± 6% vs 22.6% ± 14% PCNA-positive cells; P < .05) and with an increase in apoptotic PA-SMCs (17.7% ± 9% vs 9.4% ± 10%; P < .05). PCNA and TUNEL labeling were similar in both flow-correction groups. Collagen accumulation around the pulmonary arteries was not different across groups (Figures 2 and 3).

Expression of Genes Involved in the ET-1 and Ang-1 Pathways (Figures 4 and 5)

Compared with the sham group, the high-flow group had higher mRNA levels for ET-1, ETA, Ang-1, and Tie2; there was no difference for steady-state ETB mRNA.

ETA, Ang-1, and Tie 2 mRNA levels were not significantly different from the sham values in either of the flow-correction groups. ET-1 expression in the flow-correction group was also similar to the sham value. In the flow-correction plus anti-ETA group, ET-1 expression was lower than in the high-flow group but higher than in the sham group.

DISCUSSION

In a model of flow-induced pulmonary vasculopathy induced by 5 weeks of aortopulmonary shunting, the distal arterial medial hypertrophy resulting from smooth muscle cell proliferation and the overexpression of ET-1, ETA, Ang-1, and Tie2 in the lung parenchyma showed greater improvements 1 week after shunt closure in the animals given a selective ETA antagonist for 2 weeks than in the untreated animals.

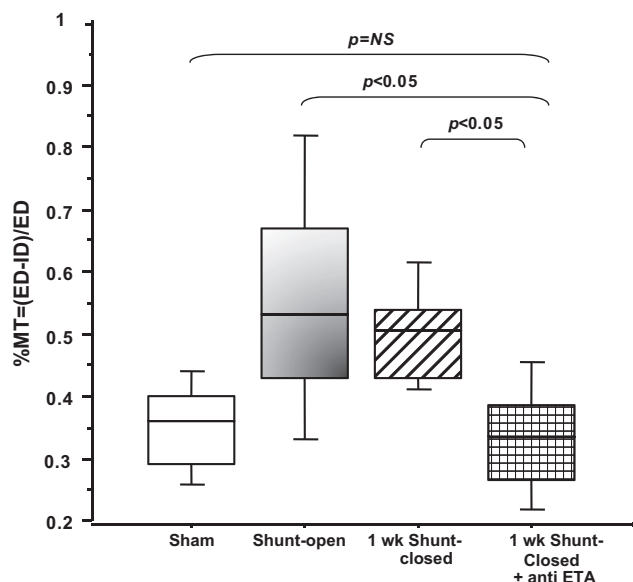


FIGURE 1. Box plot of the percentage of media thickness of small pulmonary arteries (<200 μm) assessed by morphometry (×400) in the sham group (35.5% ± 0.9%), high-flow group (54.9% ± 1.3%), flow-correction group (50.3% ± 1.3%), and flow-correction plus anti-ETA group (33.2% ± 8%). Media thickness returned to sham values 1 week after shunt closure in the group given anti-ETA therapy. MT, Media thickness; ED, external diameter; ID, internal diameter.

ET/BS

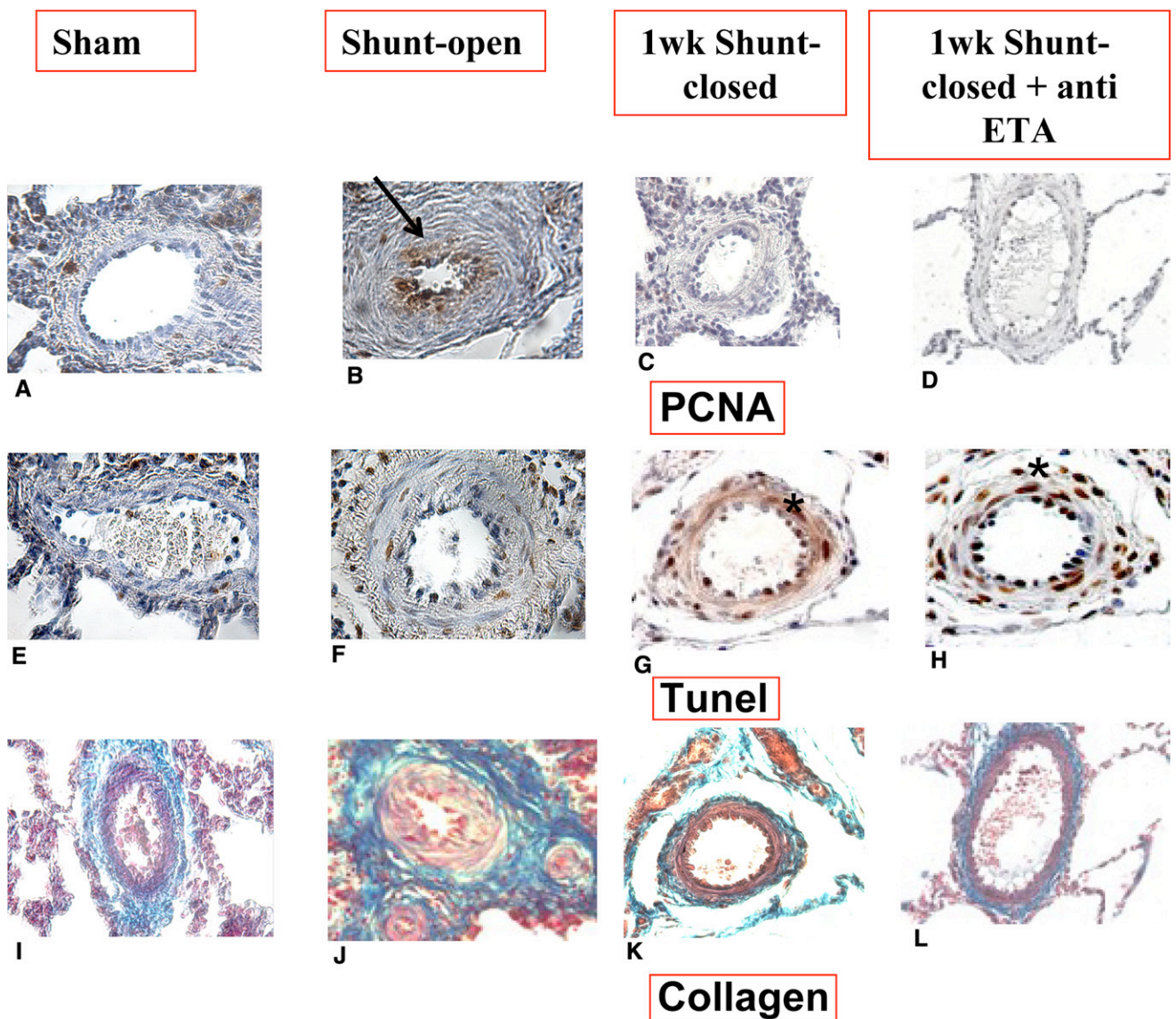


FIGURE 2. Evaluation of in situ proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) by PCNA labeling (A, B, C, D) of PA-SMC death by TUNEL (E, F, G, H) and of collagen accumulation by Masson trichrome staining (I, J, K, L) in the high-flow, flow-correction, flow-correction plus anti-ETA, and sham groups (x400). Positive cells by TUNEL and PCNA labeling are brown. Collagen is stained blue by Masson’s trichrome. Pulmonary artery medial hypertrophy in the high-flow group is related to PA-SMC proliferation (B, arrow) without intravascular collagen accumulation (J). The decrease in media thickness 1 week after shunt closure alone or with anti-ETA was associated with a decrease in PCNA-positive cells (C, D) and with an increase in TUNEL-positive cells (G, H, asterisk). Anti-ETA therapy was started 1 week before shunt closure and the smaller media thickness value in the group given anti-ETA indicates that the treatment was effective in diminishing the medial hypertrophy. TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick end labeling; ETA, endothelin receptor type A; PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

This finding supports a key role for ET-1 and ETA in the development of flow-induced pulmonary vasculopathy.

After pulmonary embolism, the unobstructed lung territory is exposed to chronic high blood flow owing to redistribution of the cardiac output.^{10,12} In patients with severe CTEPH (defined as very high PVR), extensive distal pulmonary lesions induced by high blood flow may result in failure of PTE to lower the PVR and, therefore, in increased

postoperative morbidity and mortality rates.^{10,12,13} In our animal model,²¹ 5 weeks of aortopulmonary shunting led to hypertrophy of the distal arterial media related to smooth muscle cell proliferation, as shown by PCNA labeling. We found that the flow-induced distal vasculopathy was associated with overexpression of mRNAs for ET-1, ETA, Ang-1, and Tie2. When we used shunt closure to replicate the effects of PTE on nonoccluded territories, we found that

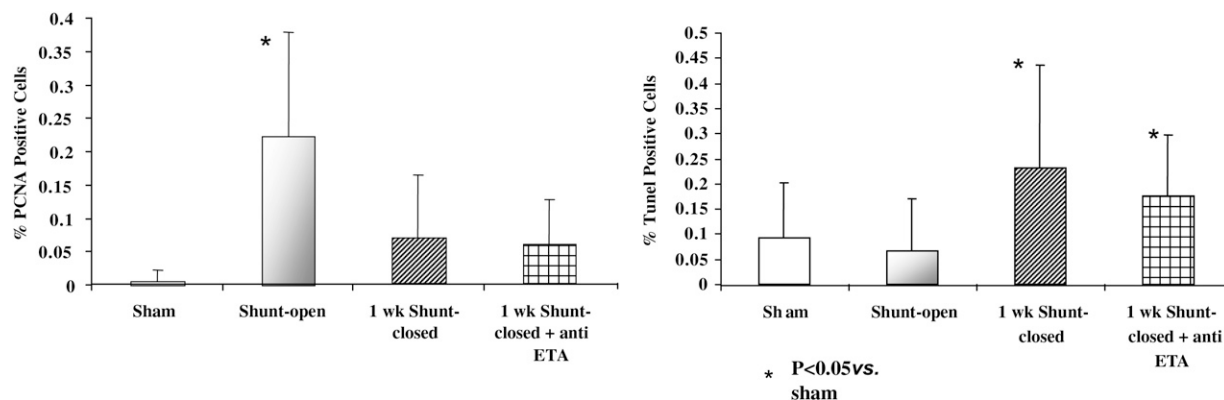


FIGURE 3. Percentage of PCNA and TUNEL-positive cells in the distal pulmonary artery wall in all groups of piglets. PA-SMC proliferation was noted in the high-flow group but was no longer present 1 week after shunt closure. PA-SMC apoptosis was increased 1 week after shunt closure with or without anti-ETA therapy. *TUNEL*, Terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick end labeling; *ETA*, endothelin receptor type A; *PCNA*, proliferating cell nuclear antigen. $P < .05$ vs sham.

the distal vasculopathy improved and the mRNAs for ET-1, ETA, Ang-1, and Tie 2 returned to sham values within 1 week. Reversal of the vasculopathy was associated with a decrease in PA-SMC proliferation and with an increase in PA-SMC apoptosis. In an earlier study, we²¹ examined piglets 5 weeks after shunt closure and found a marked improvement in the distal vascular alterations with no change in the ET-1 pathway but with overexpression of ETB mRNA. We suggested that, in our model, ETB might be involved in controlling ET-1 clearance and, consequently, might contribute to reversal of the flow-induced vasculopathy. This study²¹ showed that increased expression of ET-1 mRNA was associated with the development of distal pulmonary vasculopathy. Indeed, among endogenous vasoconstrictors, ET-1 has one of the strongest and longest lasting effects. Furthermore, ET-1 has been shown to play a pathogenic role in idiopathic PH, which is characterized by distal vascular lesions similar to those induced by high blood flow. We therefore investigated the effect of an ET-1 receptor antagonist on reversal of flow-induced vasculopathy after flow correction. We²¹ studied a selective ETA antagonist because of the possible beneficial role of the ETB receptor on reversal of flow-induced distal vasculopathy.

Administration of an ETA antagonist exerted a substantial effect on reversal of the flow-induced distal vasculopathy after flow correction. One week after shunt closure, reversal of the medial hypertrophy of distal arteries was complete in the group given the ETA antagonist and incomplete in the untreated group. In both groups, reversal of the medial hypertrophy after flow correction was due to decreased PA-SMC proliferation and increased PA-SMC apoptosis. Thus, medial hypertrophy reversal after flow correction was accelerated by treatment with a selective ETA antagonist.

One week after the shunt closure, normalization of ET-1, ETA, Ang-1, and Tie2 mRNA expressions preceded the normalization of media thickness. This result is consistent with

the key role of ET-1 and Ang-1 in distal pulmonary remodeling. ET-1 expression analysis in the group given anti-ETA therapy could be not strictly accurate inasmuch as ET-1 is the therapeutic target. Therefore, we hypothesized that the higher level of ET-1 expression in the group given anti-ETA therapy could be related to a negative feedback effect.

Over the past decade, several targeted treatments have been used in patients with PH, including prostacyclin analogs, endothelin-receptor antagonists, and phosphodiesterase-5 inhibitors. Marked structural changes in nonoccluded pulmonary arteries have been reported in CTEPH,⁷ and these targeted treatments have been used in patients with inoperable CTEPH. As mortality after pulmonary endarterectomy is increased in patients with high preoperative and postoperative PVR, such treatments are also strongly recommended preoperatively in patients with severe CTEPH. Data on the efficacy of endothelin-receptor antagonist therapy in CTEPH are limited and come mainly from nonrandomized trials. Many studies²⁴⁻²⁷ found encouraging results with the ETA/ETB antagonist bosentan in patients with inoperable CTEPH or persistent PH after PTE. Right heart catheterization values, functional status and tests, and pro-brain natriuretic peptide levels improved significantly with bosentan treatment. In a multicenter randomized trial comprising a 4-month parallel-group comparison of bosentan with a placebo, bosentan therapy significantly improved PVR and cardiac index values.²⁸ A study of patients with inoperable CTEPH diagnosed in 2003 or later, that is, after the introduction of targeted therapies, showed an 82% survival after 1 year and a 70% survival after 3 years.⁵ Nevertheless, long-term survival is best with PTE, which therefore remains the treatment of choice.⁵ These findings are consistent with a key role for distal pulmonary vasculopathy in patients with CTEPH and therefore with a major place for treatments targeting the endothelin receptors.

Conceivably, endothelin-receptor antagonist therapy might prove useful as a bridge to PTE in patients who

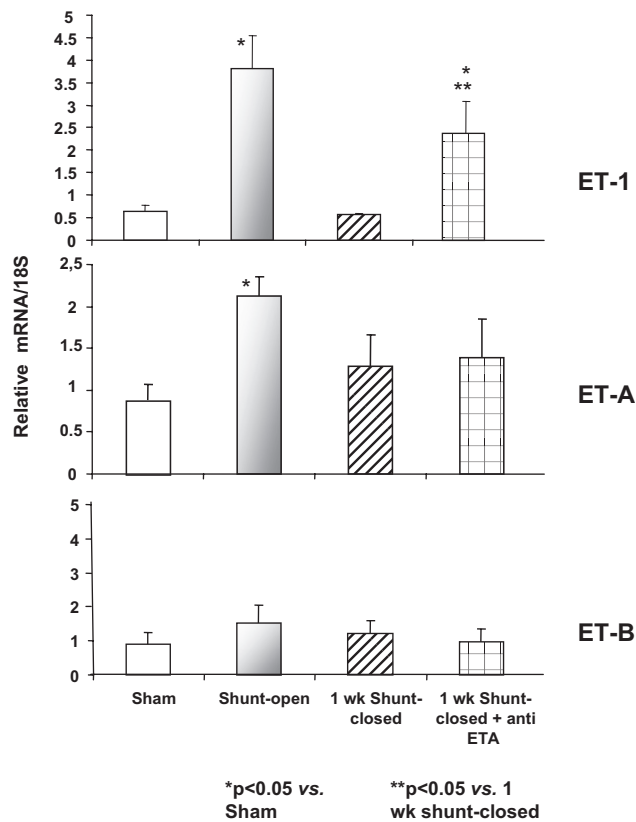


FIGURE 4. Quantification by RT-PCR of the mRNAs for endothelin-1 (*ET-1*) and its receptors (*ETA* and *ETB*) in lung parenchyma. High blood flow in the lungs increased the expression of *ET-1* and *ETA* mRNAs but did not change the steady-state level of *ETB* mRNA expression. One week after shunt closure, *ET-1* and *ETA* mRNA levels had returned to normal. Except for *ET-1*, mRNA levels decreased similarly after flow correction with and without anti-ETA therapy. The *ET-1* level remained elevated in the anti-ETA group. * $P < .05$ vs sham. ** $P < .05$ vs 1 week shunt-closed.

have a high operative risk with very high PVR values ($>900 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$) and moderate proximal artery occlusion as assessed by pulmonary angiography and thoracic computed tomography. A discrepancy between high PVR values and limited proximal occlusion is indirect evidence of major damage to the distal nonoccluded arterial bed. Our findings suggest that endothelin receptor antagonist therapy started before PTE in patients with high-risk CTEPH may accelerate the postoperative reversal of the flow-induced vasculopathy, thereby decreasing postoperative mortality.

CONCLUSION

ET-1 and its receptor *ETA* play a key role in the development of flow-induced pulmonary vasculopathy in the nonoccluded pulmonary arterial bed of patients with CTEPH. Flow correction by aortopulmonary shunt closure to replicate the effects of PTE in patients with CTEPH was followed by rapid normalization of *ET-1* expression and incomplete

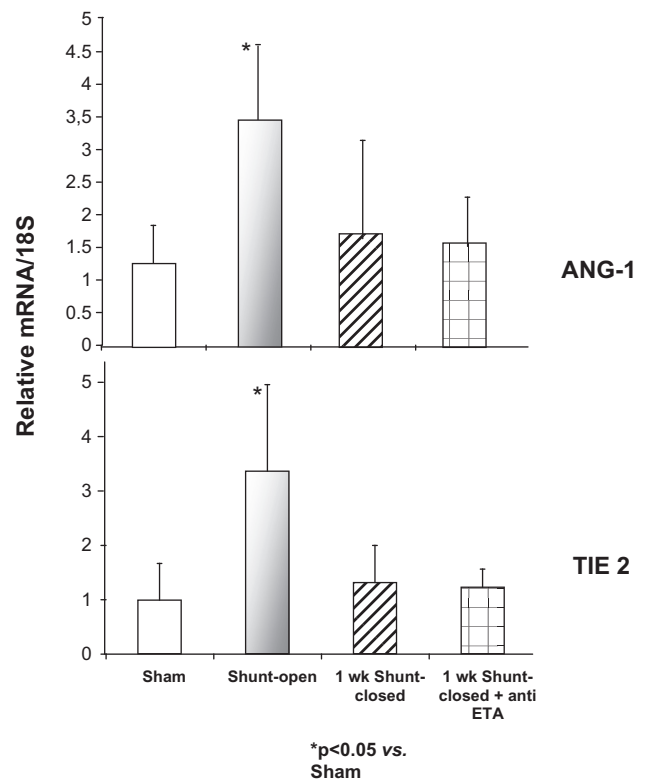


FIGURE 5. Quantification of angiotensin-1 (*Ang-1*) and Tie 2 mRNA levels in lung parenchyma from the sham, high-flow, flow-correction, and flow-correction plus anti-ETA groups. High blood flow in the lungs increased the expression of angiotensin-1 and Tie2 mRNAs. Shunt closure with or without anti-ETA reversed the overexpression of these genes. *ETA*, Endothelin receptor type A.

reversal of distal artery medial hypertrophy. When the selective *ETA* antagonist TBC3711 was used in addition to flow correction, reversal of the flow-induced alterations was accelerated. This *ETA* antagonist may hold promise for improving post-PTE outcomes in patients with CTEPH who have high PVR values, most notably those with moderate proximal occlusion.

We are grateful to Encysive Pharmaceuticals for donating the TBC3711 used in this study.

References

- Riedel M, Stanek V, Widimsky J, Prerovsky I. Long-term follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data. *Chest*. 1982;81:151-8.
- Jamieson SW, Kapelanski DP, Sakakibara N, Manecke GR, Thistlethwaite PA, Kerr KM, et al. Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1,500 cases. *Ann Thorac Surg*. 2003;76:1457-62.
- Dartevelle P, Fadel E, Chapelier A, Macchiarini P, Cerrina J, Parquin F, et al. Angioscopic video-assisted pulmonary endarterectomy for post-embolic pulmonary hypertension. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16:38-43.
- Hartz RS, Byrne JG, Levitsky S, Park J, Rich S. Predictors of mortality in pulmonary thromboendarterectomy. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:1255-9.
- Condliffe R, Kiely DG, Gibbs JS, Corris PA, Peacock AJ, Jenkins DP, et al. Improved outcomes in medically and surgically treated chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1122-7.

6. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, Chapelier A, Hervé P, de Perrot M, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2004;23:637-48.
7. Moser KM, Bloor CM. Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 1993;103:685-92.
8. Azarian R, Wartski M, Collignon MA, Parent F, Hervé P, Sors H, et al. Lung perfusion scans and hemodynamics in acute and chronic pulmonary embolism. *J Nucl Med*. 1997;38:980-3.
9. Yi ES, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, et al. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(4 Pt 1):1577-86.
10. Hoepfer MM, Mayer E, Simonneau G, Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006;113:2011-20.
11. Egermayer P, Peacock AJ. Is pulmonary embolism a common cause of chronic pulmonary hypertension? Limitations of the embolic hypothesis. *Eur Respir J*. 2000;15:440-8.
12. Moser KM, Braunwald NS. Successful surgical intervention in severe chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 1973;64:29-35.
13. Peacock A, Simonneau G, Rubin L. Controversies, uncertainties and future research on the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:608-14.
14. Anderson EG, Simon G, Reid L. Primary and thromboembolic pulmonary hypertension: a quantitative pathological study. *J Pathol*. 1972;110:273-93.
15. Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation*. 1958;18:533-47.
16. Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, van Beneden R, Rimmelink M, Brimiouille S, et al. Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2003;107:1329-35.
17. Reddy VM, Wong J, Liddicoat JR, Johengen M, Chang R, Fineman JR. Altered endothelium-dependent responses in lambs with pulmonary hypertension and increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol*. 1996;271:H562-70.
18. Ovadia B, Reinhartz O, Fitzgerald R, Bekker JM, Johengen MJ, Azakie A, et al. Alterations in ET-1, not nitric oxide, in 1-week-old lambs with increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H480-90.
19. Black SM, Fineman JR, Steinhorn RH, Bristow J, Soifer SJ. Increased endothelial NOS in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1998;275:H1643-51.
20. Galiè N, Kim NH. Pulmonary microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:571-6.
21. Mercier O, Sage E, de Perrot M, Tu L, Marcos E, Decante B, et al. Regression of flow-induced pulmonary arterial vasculopathy after flow correction in piglets. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;137:1538-46.
22. Wu C, Decker ER, Blok N, Bui H, You TJ, Wang J, et al. Discovery, modeling, and human pharmacokinetics of *N*-(2 acetyl-4,6-dimethylphenyl)-3-(3,4-dimethylisoxazol-5-ylsulfamoyl)thiophene-2-carboxamide (TBC3711), a second generation, ETA selective, and orally bioavailable endothelin antagonist. *J Med Chem*. 2004;47:1969-86.
23. Perreault T, Berkenbosch JW, Barrington KJ, Decker ER, Wu C, Brock TA, et al. TBC3711, an ET(A) receptor antagonist, reduces neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension in piglets. *Pediatr Res*. 2001;50:374-83.
24. Bresser P, Pepke-Zaba J, Jais X, Humbert M, Hoepfer MM. Medical therapies for chronic thromboembolic pulmonary hypertension: an evolving treatment paradigm. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:594-600.
25. Bonderman D, Nowotny R, Skoro-Sajer N, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Klepetko W, et al. Bosentan therapy for inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 2005;128:2599-603.
26. Hoepfer MM, Kramm T, Wilkens H, Schulze C, Schäfers HJ, Welte T, et al. Bosentan therapy for inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 2005;128:2363-7.
27. Hughes RJ, Jais X, Bonderman D, Suntharalingam J, Humbert M, Lang I, et al. The efficacy of bosentan in inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a 1-year follow-up study. *Eur Respir J*. 2006;28:138-43.
28. Jais X, D'Armini AM, Jansa P, Torbicki A, Delcroix M, Ghofrani HA, et al., Bosentan Effects in iNopErable Forms of chronic Thromboembolic pulmonary hypertension Study Group. Bosentan for treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: BENEFIT (Bosentan Effects in iNopErable Forms of chronic Thromboembolic pulmonary hypertension), a randomized, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2127-34.

QUATRIÈME ÉTUDE

Rôle de l'ischémie chronique pulmonaire dans le développement de la vasculopathie dans les territoires vasculaires pulmonaires non obstrués.

Papier soumis.

Une des raisons du manque de connaissances physiopathologiques de l'HTPPE est l'absence à ce jour de modèle animal validé de la maladie. Il s'agit d'une maladie chronique s'installant progressivement dans le temps associant une maladie pulmonaire complexe à double composantes : la maladie obstructive et le remodelage vasculaire. Le territoire pulmonaire obstrué et sa reperfusion ont été modélisés et étudiés dans notre laboratoire [39-41].

Dans les deuxième et troisième études, nous avons modélisé et étudié le territoire pulmonaire non obstrué de l'HTPPE. L'hyper-débit chronique induit des lésions micro-vasculaires à type d'épaississement de la media artérielle. L'ET-1 et son récepteur ETA sont des cibles thérapeutiques efficaces puisqu'un antagoniste de l'ETA permet une accélération de la régression de la vasculopathie pulmonaire d'hyperdébit après l'arrêt du shunt.

Conscient que le modèle d'hyper-débit ne reflète qu'une partie de la maladie, et ayant constaté qu'une pneumonectomie chez un patient n'ayant pas d'HTP n'entraîne pas d'HTP nous avons comparé un modèle d'hyper-débit, (pneumonectomie droite), à un modèle mixte d'hyper-débit et d'obstruction vasculaire pulmonaire (ligature de l'artère pulmonaire droite) afin d'identifier des phénomènes d'interaction entre les 2 territoires.

Fort de cette hypothèse, nous avons comparé 3 groupes de 10 cochons :

- un groupe de cochons pneumonectomisés à droite (groupe hyper-débit).
- un groupe de cochons dont l'artère pulmonaire droite a été ligaturée (groupe interaction des territoires).
- un groupe de cochons témoins.

Nous avons pu ainsi pour la première fois montrer que l'ischémie chronique du poumon joue un rôle majeur dans le développement des lésions de remodelage vasculaire dans l'HTPPE.

1. Matériel et méthode

a. Modèle animal

Pour cette étude 30 porcelets seront utilisés. Les porcelets utilisés sont de variété « large white » et d'un poids de 22 ± 4 kg. Les porcelets ont été répartis de façon aléatoire dans trois groupes de 10 animaux:

- Groupe pneumonectomie droite (PDte).

Cette pneumonectomie sera réalisée par sternotomie médiane et par section/agrafage électifs des différents éléments du hile pulmonaire droit.

- Groupe ligature de l'artère pulmonaire droite (LApDte).

La ligature de l'artère pulmonaire droite est réalisée, au fil non résorbable, en intra-péricardique par sternotomie médiane.

- Groupe témoin.

Ne sera réalisée dans ce groupe qu'une dissection du hile pulmonaire droit par sternotomie médiane.

Tous les animaux seront sacrifiés après une période de 5 semaines.

b. Hémodynamique

Au cours des différentes manipulations, l'électrocardiogramme, la fréquence cardiaque et la saturation artérielle périphérique en oxygène étaient évalués en continu pendant toute la durée des interventions chirurgicales.

Avant et après les manipulations à sternum ouvert, les pressions dans l'aorte et dans l'artère pulmonaire étaient mesurées par ponction directe. Le débit cardiaque (Qc) était mesuré aux mêmes moments par le biais d'un anneau doppler (T 106, Transonic systems Inc) que l'on disposait autour de la racine aortique. Par ailleurs des gaz du sang aortique et pulmonaire, par ponction directe, étaient réalisés systématiquement, juste après les mesures de pression, après 15 minutes de ventilation avec une FiO₂ 100%.

Enfin, les RPT étaient évaluées en calculant le rapport débit-pression.

c. Étude morphométrique de l'épaississement de la média des artérioles pulmonaires

L'épaisseur de la média des artérioles pulmonaires était calculée sur les prélèvements pulmonaires inclus en paraffine, coupés et fixés sur lame. Une coloration Hémalum-Eosine-Safran (HES) était réalisée. La morphométrie des artères pulmonaires était réalisée au microscope avec l'optique x400. L'épaisseur de la média ($EM=DE-DI$ où DI est le diamètre interne et DE le diamètre externe de l'artériole mesurée) était rapportée au diamètre total du vaisseau selon la formule suivante : $\%EM = (DE-DI)/DE \times 100$.

d. Étude de la vaso-réactivité pulmonaire in vitro

Après avoir évalué la relaxation et contraction maximales des anneaux d'artère pulmonaire par le nitroprussiate de sodium et la phényléphrine, l'effet de l'endothéline-1 et de l'acétylcholine ont été étudiés.

e. Étude de l'expression génique des facteurs de croissance : VEGF, PDGF, Insuline growth factor (IGF) au sein du parenchyme pulmonaire gauche.

Cette étude de l'expression de gènes du VEGF, PDGF ainsi que de l'IGF est réalisée par RTQ-PCR.

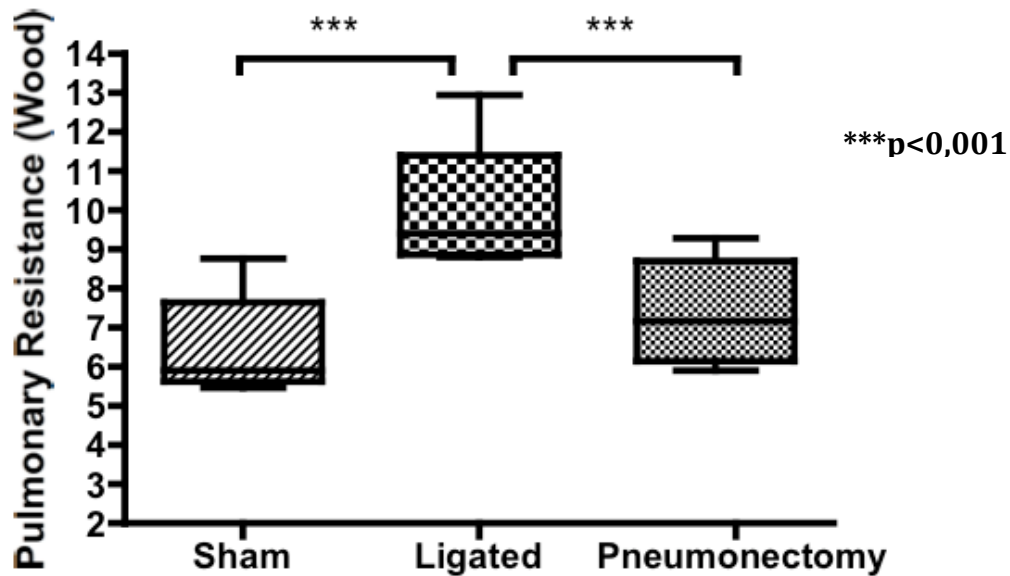
f. Étude de l'expression des gènes des voies ET-1 et NOS : ET-1, ETA, ETB et NOS-e au sein du parenchyme pulmonaire gauche.

L'étude de l'expression de gènes de ET-1, ETA, ETB ainsi que de la NOS-e est faite également par RTQ-PCR.

2. Résultats

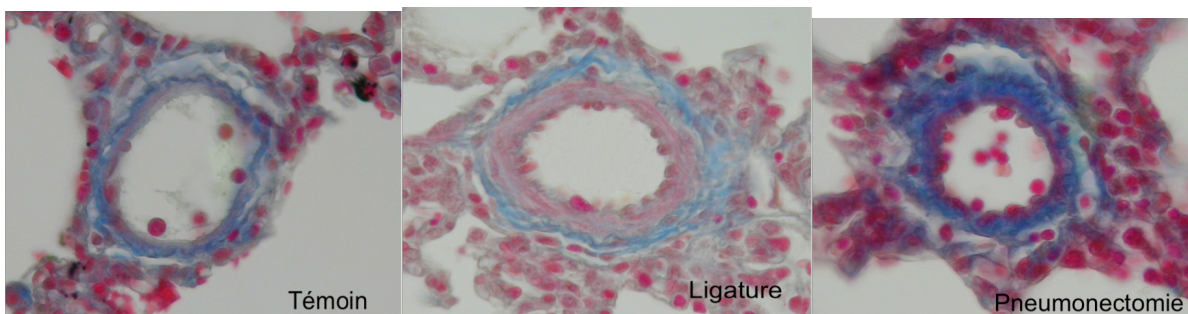
a. Hémodynamique

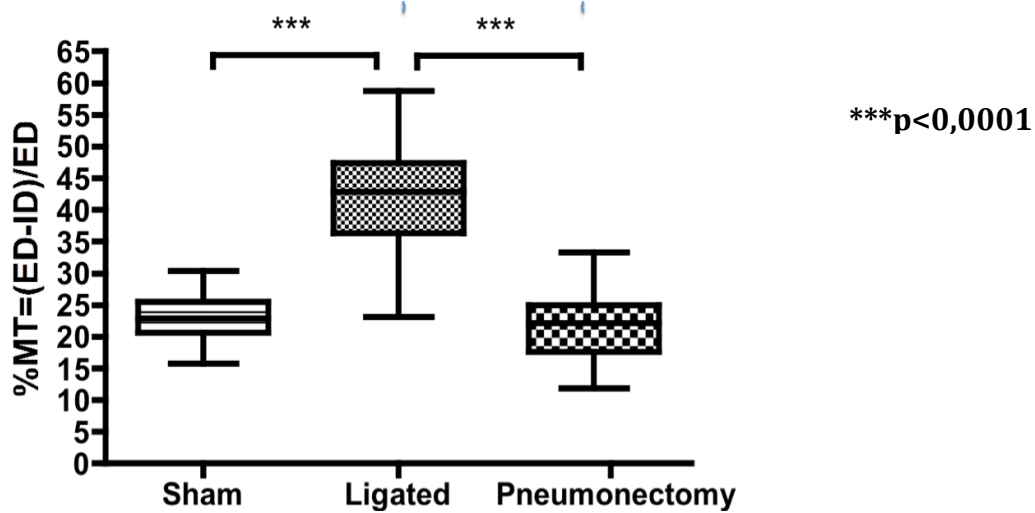
Les résistances pulmonaires (en unité Wood) du groupe LApDte sont significativement plus élevées comparé au groupe PDte ($10,05 \pm 0,47$ vs $7,34 \pm 0,38$ avec un $p=0,0003$) mais aussi comparé au groupe témoin ($10,05 \pm 0,47$ vs $6,48 \pm 0,59$ avec un $p=0,0006$). Il n'y a pas de différence entre le groupe PDte et le groupe témoin ($7,34 \pm 0,38$ vs $6,48 \pm 0,59$ avec un $p=0,23$).



b. Étude morphométrique de l'épaississement de la média des artérioles pulmonaires.

L'épaississement de la média des artérioles pulmonaires est significativement plus importante après ligature de l'artère pulmonaire droite par rapport au groupe PDte ($42,28 \pm 1,11$ vs $21,83 \pm 0,68$ avec un $p < 0,0001$) mais aussi par rapport au groupe témoin ($42,28 \pm 1,11$ vs $22,91 \pm 0,65$ avec un $p < 0,0001$). Il n'y a pas de différence entre le groupe PDte et le groupe témoin ($21,83 \pm 0,68$ vs $22,91 \pm 0,65$ avec un $p = 0,29$).

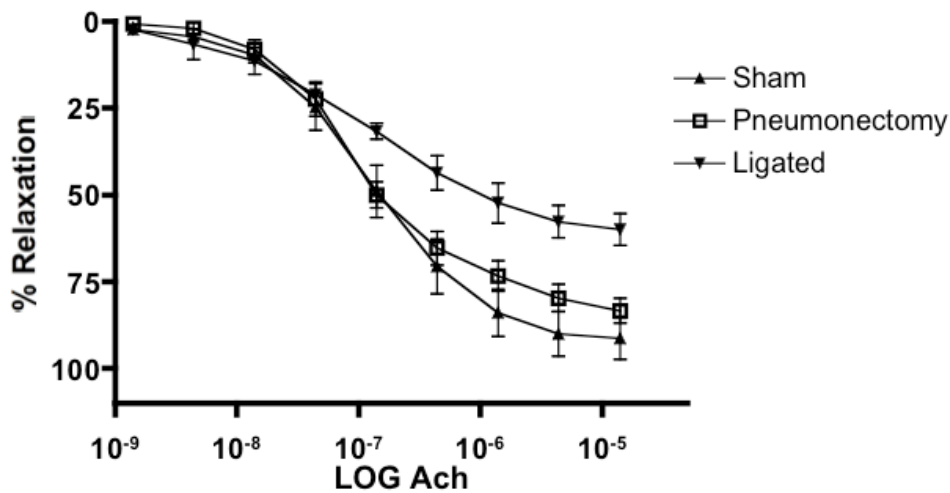




c. Étude de la vaso-réactivité pulmonaire in vitro

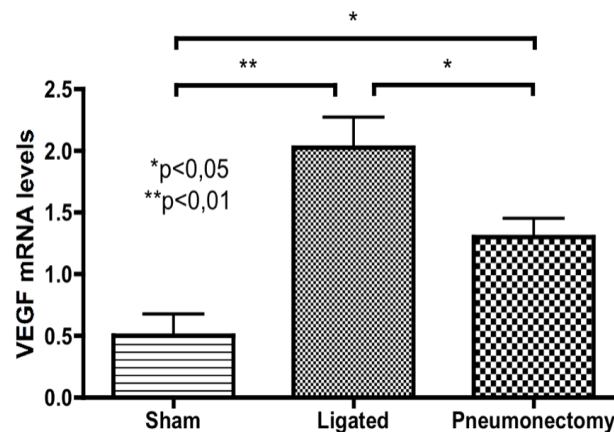
La relaxation maximale à l'Acétylcholine était significativement moins importante dans le groupe LApDte par rapport au groupe PDte ($60 \pm 4,58$ vs $83 \pm 3,53$ avec un $p=0,0157$). La différence est aussi significative entre le groupe LApDte et le groupe témoin ($60 \pm 4,58$ vs $91,33 \pm 5,92$ avec un $p=0,0139$). Il n'y a pas de différence entre les groupes PDte et Témoin ($83 \pm 3,53$ vs $91,33 \pm 5,92$ avec un $p=0,31$)

Les contractions ou relaxations non endothélium dépendantes sont identiques entre les différents groupes.

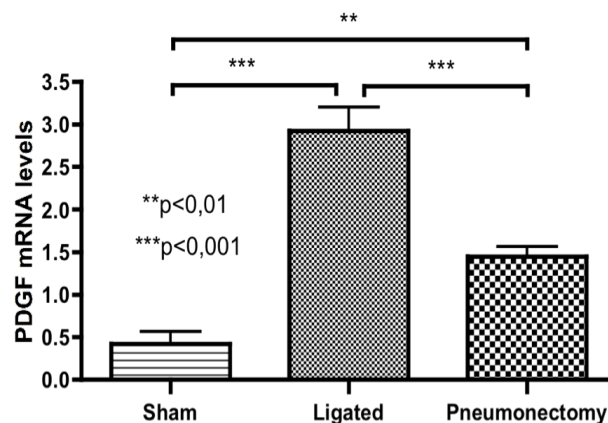


d. Expression des gènes des facteurs de croissance angiogéniques VEGF, PDGF et IGF dans le parenchyme pulmonaire gauche.

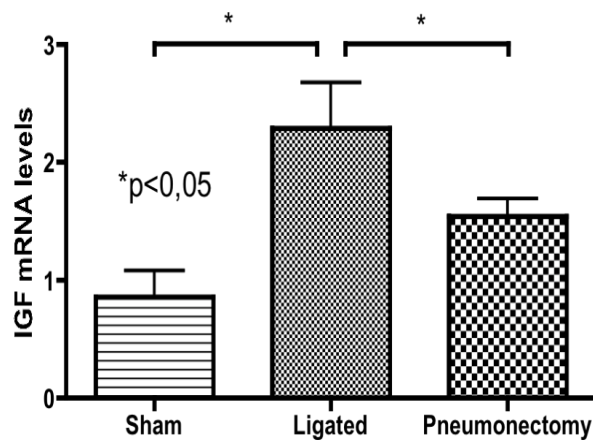
L'expression du VEGF est significativement augmentée entre le groupe LApDte et le groupe PDte ($2,026 \pm 0,244$ vs $1,298 \pm 0,151$ avec un $p=0,0348$), entre le groupe LApDte et le groupe témoin ($2,026 \pm 0,244$ vs $0,5 \pm 0,175$ avec un $p=0,0019$) et entre le groupe PDte et le groupe Témoin ($1,298 \pm 0,151$ vs $0,5 \pm 0,175$ avec un $p=0,0105$).



L'expression du PDGF est significativement augmentée entre le groupe LApDte et le groupe PDte ($2,924 \pm 0,28$ vs $1,446 \pm 0,115$ avec un $p=0,0012$), entre le groupe LApDte et le groupe témoin ($2,924 \pm 0,28$ vs $0,418 \pm 0,147$ avec un $p<0,0001$) et entre le groupe PDte et le groupe Témoin ($1,446 \pm 0,115$ vs $0,418 \pm 0,147$ avec un $p=0,0006$).

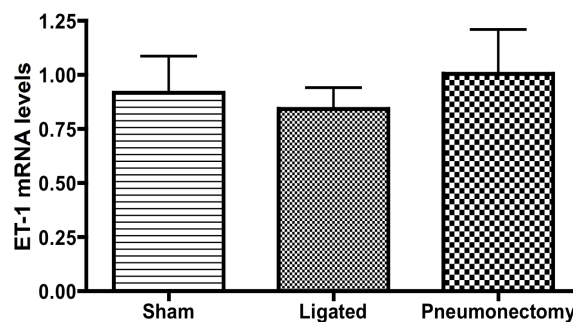


L'expression de l'IGF est significativement augmentée entre le groupe LApDte et le groupe PDte ($2,29 \pm 0,387$ vs $1,542 \pm 0,15$ avec un $p=0,0342$), entre le groupe LApDte et le groupe témoin ($2,29 \pm 0,387$ vs $0,857 \pm 0,225$ avec un $p=0,0205$). Il n'y a pas de différence entre le groupe PDte et le groupe Témoin ($1,542 \pm 0,15$ vs $0,857 \pm 0,225$ avec un $p=0,1089$).

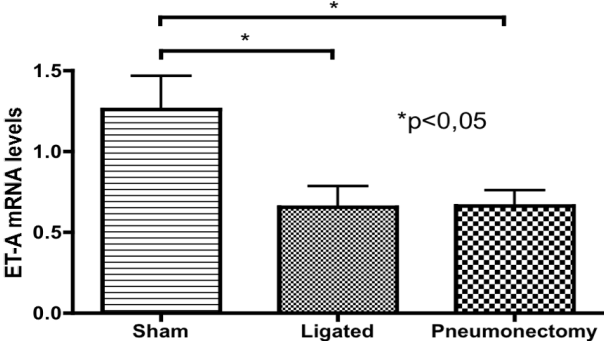


e. Expression des gènes des voies ET-1 et NOS : ET-1, ETA, ETB et NOS-e au sein du parenchyme pulmonaire gauche.

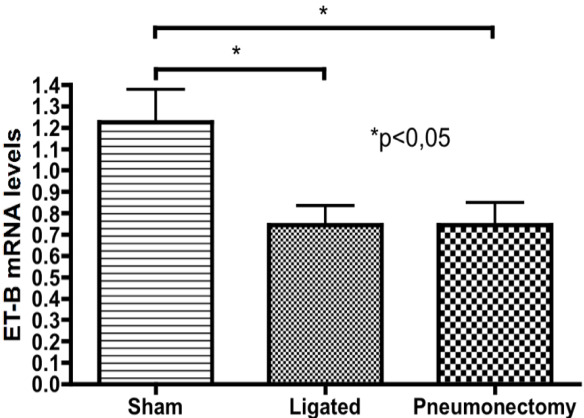
Il n'y a aucune différence d'expression de ET-1 entre les différents groupes.



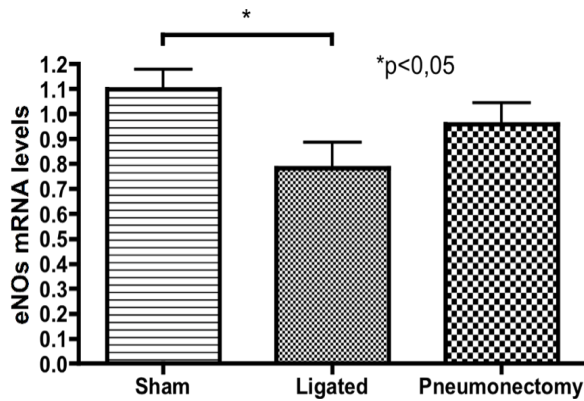
L'expression de ETA est significativement plus faible dans le groupe LApDte par rapport au groupe Témoin ($0,654 \pm 0,132$ vs $1,26 \pm 0,208$ avec un $p=0,0391$) et dans le groupe PDte par rapport au groupe Témoin ($0,6625 \pm 0,098$ vs $1,26 \pm 0,208$ avec un $p=0,0486$). Il n'y pas de différence entre les groupes LApDte et PDte.



L'expression de ETB est significativement plus faible dans le groupe LApDte par rapport au groupe Témoin ($0,740 \pm 0,1044$ vs $1,224 \pm 0,1555$ avec un $p=0,0285$) et dans le groupe PDte par rapport au groupe Témoin ($0,740 \pm 0,091$ vs $1,224 \pm 0,1555$ avec un $p=0,0335$). Il n'y pas de différence entre les groupes LApDte et PDte.



L'expression de NOS-e est significativement plus faible dans le groupe LApDte par rapport au groupe Témoin ($0,784 \pm 0,1026$ vs $1,1 \pm 0,079$ avec un $p=0,0409$). Il n'y a pas d'autre différence significative entre les groupes.



3. Conclusion

Nous avons pu grâce à cette étude démontrer pour la première fois l'importance de l'ischémie chronique pulmonaire dans la physiopathologie du remodelage vasculaire dans l'HTPPE.

Les facteurs de prolifération des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire (VEGF, PDGF et IGF) doivent probablement jouer un rôle important dans le développement du remodelage. Par opposition les facteurs endothéliaux (ET-1, ETA, ETB et NOS-e) semblent être inhibés dans ce mécanisme d'interaction ischémique témoignant de la dysfonction endothéliale dans le territoire non obstrué. Cette dysfonction est également traduite par l'altération de la relaxation endothélium dépendante.

DISCUSSION

Notre dernière étude semble démontrer le caractère prépondérant de l'ischémie chronique dans le développement des lésions de remodelage vasculaire rencontrées dans l'HTPPE.

L'obstruction vasculaire est responsable du développement de la vasculopathie post-obstructive. Cette vasculopathie obstructive désigne les modifications de la circulation bronchique et le remodelage vasculaire pulmonaire qui apparaissent après ischémie chronique pulmonaire obtenue par obstruction de l'artère pulmonaire.

La formation d'un vaisseau sanguin est sous la dépendance de 3 mécanismes distincts (103):

- La Vasculogénèse ou Néangiogénèse qui est la formation de nouveaux vaisseaux sous la dépendance des cellules souches circulantes.

- L'Angiogénèse qui est le développement de vaisseaux déjà existant.

- L'Artériogénèse qui est le remodelage vasculaire permettant une augmentation du flux sanguin.

Dans ces 3 mécanismes, le HIF joue un rôle prépondérant. Des études sur des souris KO pour le HIF- α ont en effet souligné le rôle du HIF-1 dans le développement du système cardiovasculaire. Ces souris ont développé des anomalies vasculaires et cardiaques lors de l'embryogénèse (104, 105).

L'angiogénèse est un mécanisme complexe dont le médiateur principal est la cellule endothéliale (106, 107), sous la dépendance du HIF dans des conditions d'hypoxie.

En effet le HIF contrôle les principaux protagonistes de l'angiogénèse en commençant par la voie du NO synthase (eNOS et i-NOS) (108-110).

Le rôle de l'Angiopoïétine-1 (Ang-1) est essentiel au développement vasculaire pulmonaire par l'intermédiaire de son récepteur Tie-2. L'Ang-1 stabilise le développement des vaisseaux sanguins en recrutant les cellules musculaires lisses, par migration et par division de celles-ci, autour des tubes endothéliaux, créant des

structures artérielles matures (111). Dans des conditions hypoxiques, l'angiopœtine-2 (Ang-2) est sécrétée. Cette dernière vient antagoniser l'effet de l'Ang-1 sur la cellule endothéliale (112). Il a été montré récemment une réponse angiogénique directe de la voie de l'Ang-2 par des agonistes du récepteur Tie-2(113). La régulation hypoxique de Ang-1 et Ang-2 n'est pas claire. Cependant, il semblerait que la régulation de Ang-2 en condition hypoxique soit sous la dépendance de HIF (114, 115). En effet, il a été démontré que l'induction de Tie-2 pouvait être obtenue par une sur-expression de HIF-2 α (106).

Le contrôle du VEGF paraît d'une importance majeure dans la régulation endothéliale de l'angiogénèse par l'intermédiaire du HIF. Il a clairement été démontré que le HIF-1 α est spécifique de la cellule endothéliale(116). Dans cette étude sur un modèle tumoral murin de souris HIF-1 α KO, alors que l'ensemble de l'embryologie vasculaire était normal, l'angiogénèse tumorale était diminuée. Cette diminution de l'angiogénèse tumorale était associée dans le groupe HIF-1 α KO à une diminution de l'expression du VEGF et de son récepteur 2 (VEGF-R2). L'étude de HIF-2 α a permis de montrer son rôle dans le contrôle de HIF-2 mais aussi de HIF-1 (117). Dans ce modèle les lésions vasculaires embryologiques étaient majeures. Il est donc clair que HIF-1 interfère dans la régulation des facteurs initiaux du développement angiogénique mais aussi dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux.

L'implication de HIF dans la genèse du remodelage-hypoxique de l'hypertension artérielle pulmonaire a été suggérée après l'observation de l'augmentation de certains facteurs sous la dépendance de HIF : l'ET-1 (68), le PDGF (91, 92) et le VEGF (88).

Ce rôle de HIF-1 α et de HIF-2 α dans le développement de L'HTAP hypoxique a bien été démontré grâce à des modèles de souris HIF-1 α KO et de HIF-2 α KO (118, 119). Les souris HIF-1 α +/- développent moins de polyglobulie, moins d'hypertrophie du ventricule droit, et moins d'hypertension pulmonaire. Ces données sont corrélées à une diminution du remodelage vasculaire (119). Chez les souris HIF-2 α +/-, il n'a été observé aucune lésion histologique de remodelage vasculaire d'hypertension pulmonaire. L'hypothèse de cette protection du génotype HIF-2 α est une inhibition de la voie de l'endothéline 1. Alors que la fixation de l'ET-1 sur les récepteurs ETA des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires engendre une puissante vasoconstriction par

une augmentation rapide de la concentration calcique intracellulaire et une activation prolongée de la protéine kinase C (120), il semblerait que sa fixation sur son récepteur ETB ait un rôle protecteur du remodelage vasculaire(121).

L'inhibition d'un ou plusieurs canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires résistives par l'hypoxie engendre une vasoconstriction pulmonaire par une augmentation de la concentration cytosolique du calcium (78, 80, 81). Le rôle du HIF dans la régulation des Kv, dans la dépolarisation membranaire et du taux de calcium intracellulaire a été suggéré (113, 122).

Beaucoup d'autres facteurs, dépendant du HIF, sont impliqués dans la genèse du remodelage vasculaire comme l'Insulin-Growth-Factor (IGF)(123) et le PDGF (95, 124, 125).

En conclusion, le HIF semble impliqué dans la régulation de tous les protagonistes concernés dans la genèse du remodelage vasculaire rencontré dans l'hypertension pulmonaire post-embolique. Il peut être impliqué dans des mécanismes paracrine, autocrine ou endocrine. Il est induit par l'ischémie chronique (hypoxie). Le HIF ne pourrait-il pas être à la base de la signalisation de l'interaction entre les territoires ischémiques et les territoires libres rencontrés dans l'hypertension pulmonaire post-embolique ?

PERSPECTIVES

La poursuite de nos travaux va tenter de démontrer le rôle du VEGF et du PDGF dans la formation de la vasculopathie pulmonaire post-obstructive associant un remodelage vasculaire pulmonaire et une hyper-vascularisation bronchique. En effet, il est établi que l'hypoxie induit la production de facteurs dont le VEGF, facteur angiogénique, et le PDGF, stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses pulmonaires, font partie. Nous pensons qu'un même signal (l'ischémie) induit, via la production de molécules (VEGF, PDGF), l'hypervascularisation bronchique et le remodelage vasculaire pulmonaire et que ce signal peut être HIF.

1. Étude sur le rôle du HIF dans le remodelage vasculaire.

Nous allons utiliser le modèle d'ischémie chronique pulmonaire chez le cochon par ligature de l'artère pulmonaire droite pendant 5 semaines. Nous nous proposons de rechercher les modifications d'expression du HIF dans le poumon droit ischémique (du côté de la ligature de l'artère pulmonaire), dans le poumon gauche (poumon controlatérale à la ligature) et dans un groupe contrôle. Nous réaliserons des dosages réguliers du HIF dans le sang périphérique afin de prouver le mécanisme endocrinien de son action.

2. Étude de l'inhibition du remodelage vasculaire par le SORAFENIB et par l'IMATINIB

En utilisant le modèle d'ischémie chronique pulmonaire chez le cochon par ligature de l'artère pulmonaire droite, le SORAFENIB (un inhibiteur du VEGFR, PDGFR) et l'IMATINIB (un inhibiteur du PDGFR) seront délivrés de façon quotidienne après ligature de l'artère pulmonaire droite. Ainsi 4 groupes de 5 cochons seront comparés : le groupe ligature étudié 5 semaines après la ligature de l'artère pulmonaire droite, le groupe Sorafenib étudié 5 semaines après la ligature de l'artère pulmonaire droite et un traitement concomitant par Sorafenib, le groupe Imatinib étudié 5 semaines après la ligature de l'artère pulmonaire droite et un traitement concomitant par Imatinib et le groupe Sham étudié après dissection sans ligature de l'artère pulmonaire droite.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lewczuk J, Piszko P, Jagas J, Porada A, Wojciak S, Sobkowicz B, et al. Prognostic factors in medically treated patients with chronic pulmonary embolism. *Chest*. 2001 Mar;119(3):818-23.
2. Riedel M, Stanek V, Widimsky J, Prerovsky I. Longterm follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data. *Chest*. 1982 Feb;81(2):151-8.
3. Becattini C, Agnelli G, Pesavento R, Silingardi M, Poggio R, Taliani M, et al. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after a first episode of pulmonary embolism. *Chest*. 2006 Jul;130(1):172-5.
4. Pengo V, Lensing A, Prins M, Marchiori A, Davidson B, Tiozzo F, et al. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 2004 May 27;350(22):2257-64.
5. Ribeiro A, Lindmarker P, Johnsson H, Juhlin-Dannfelt A, Jorfeldt L. Pulmonary embolism: one-year follow-up with echocardiography doppler and five-year survival analysis. *Circulation*. 1999 Mar 16;99(10):1325-30.
6. Goldhaber S, Hennekens C, Evans D, Newton E, Godleski J. Factors associated with correct antemortem diagnosis of major pulmonary embolism. *Am J Med*. 1982 Dec;73(6):822-6.
7. Rubinstein I, Murray D, Hoffstein V. Fatal pulmonary emboli in hospitalized patients. An autopsy study. *Arch Intern Med*. 1988 Jun;148(6):1425-6.
8. Lang I. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension--not so rare after all. *N Engl J Med*. 2004 May 27;350(22):2236-8.
9. Wolf M, Boyer-Neumann C, Parent F, Eschwege V, Jaillet H, Meyer D, et al. Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2000 Feb;15(2):395-9.
10. Skoro-Sajer N, Hack N, Sadushi-Kolici R, Bonderman D, Jakowitsch J, Klepetko W, et al. Pulmonary vascular reactivity and prognosis in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a pilot study. *Circulation*. 2009 Jan 20;119(2):298-305.
11. Hoepfer M, Mayer E, Simonneau G, Rubin L. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006 Apr 25;113(16):2011-20.
12. Moser K, Braunwald N. Successful surgical intervention in severe chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 1973 Jul;64(1):29-35.
13. Yi E, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, et al. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 1):1577-86.
14. Moser K, Bloor C. Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 1993 Mar;103(3):685-92.
15. Lang IM, Klepetko W, Pabinger I. No increased prevalence of the factor V Leiden mutation in chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). *Thromb Haemost*. 1996 Sep;76(3):476-7.
16. Bonderman D, Turecek PL, Jakowitsch J, Weltermann A, Adlbrecht C, Schneider B, et al. High prevalence of elevated clotting factor VIII in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost*. 2003 Sep;90(3):372-6.

17. Le Gal G, Delahousse B, Lacut K, Malaviolle V, Regina S, Blouch M, et al. Fibrinogen Aalpha-Thr312Ala and factor XIII-A Val34Leu polymorphisms in idiopathic venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2007;121(3):333-8.
18. Bonderman D, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Schemper M, Kyrle P, Schonauer V, et al. Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost.* 2005 Mar;93(3):512-6.
19. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):321-7.
20. Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. *Thromb Haemost.* 2005 Aug;94(2):362-5.
21. Kimura H, Okada O, Tanabe N, Tanaka Y, Terai M, Takiguchi Y, et al. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 and pulmonary vascular resistance in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jul 15;164(2):319-24.
22. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet.* 2000 Sep;67(3):737-44.
23. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet.* 2000 Oct;37(10):741-5.
24. Sztrymf B, Yaici A, Jais X, Simonneau G, Sitbon O, Humbert M. [Genetics of pulmonary arterial hypertension: recent data and practical applications]. *Rev Mal Respir.* 2005 Nov;22(5 Pt 1):796-805.
25. Sullivan CC, Du L, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, et al. Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12331-6.
26. Du L, Sullivan CC, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, et al. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):500-9.
27. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation.* 2002 Mar 5;105(9):1034-6.
28. Kim H, Yung GL, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA, Chiles PG, et al. Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2000 Apr;15(4):640-8.
29. Moser K, Auger W, Fedullo P. Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation.* 1990 Jun;81(6):1735-43.
30. Kim N, Fesler P, Channick R, Knowlton K, Ben-Yehuda O, Lee S, et al. Preoperative partitioning of pulmonary vascular resistance correlates with early outcome after thromboendarterectomy for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation.* 2004 Jan 6;109(1):18-22.
31. Bonderman D, Skoro-Sajer N, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Dunkler D, Taghavi S, et al. Predictors of outcome in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation.* 2007 Apr 24;115(16):2153-8.
32. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, Le Roy Ladurie F. [Surgical treatment of pulmonary arterial hypertension]. *Rev Prat.* 2008 Nov 30;58(18):2031-5.
33. Galie N, Hoeper M, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J, Barbera J, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of

- Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2009 Oct;30(20):2493-537.
34. Simonneau G, Robbins I, Beghetti M, Channick R, Delcroix M, Denton C, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S43-54.
 35. Condliffe R, Kiely D, Gibbs J, Corris P, Peacock A, Jenkins D, et al. Prognostic and aetiological factors in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009 Feb;33(2):332-8.
 36. Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, Schafers H, Jansa P, Lindner J, et al. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009 Feb;33(2):325-31.
 37. Jais X, Iosifescu V, Jardim C, Sitbon O, Parent F, Hamid A, et al. Splenectomy and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thorax*. 2005 Dec;60(12):1031-4.
 38. Bonderman D, Jakowitsch J, Redwan B, Bergmeister H, Renner MK, Panzenbock H, et al. Role for staphylococci in misguided thrombus resolution of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Apr;28(4):678-84.
 39. Suntharalingam J, Goldsmith K, van Marion V, Long L, Treacy C, Dudbridge F, et al. Fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism is associated with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2008 Apr;31(4):736-41.
 40. Moser KM, Houk VN, Jones RC, Hufnagel CC. Chronic, massive thrombotic obstruction of the pulmonary arteries. Analysis of four operated cases. *Circulation*. 1965 Sep;32(3):377-85.
 41. Sabiston DC, Jr., Wolfe WG, Oldham HN, Jr., Wechsler AS, Crawford FA, Jr., Jones KW, et al. Surgical management of chronic pulmonary embolism. *Ann Surg*. 1977 Jun;185(6):699-712.
 42. Moser KM, Auger WR, Fedullo PF, Jamieson SW. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: clinical picture and surgical treatment. *Eur Respir J*. 1992 Mar;5(3):334-42.
 43. Anderson K, Jamieson A. Agglutination test for the investigation of the genus *Naegleria*. *Pathology*. 1972 Oct;4(4):273-8.
 44. Azarian R, Wartski M, Collignon MA, Parent F, Herve P, Sors H, et al. Lung perfusion scans and hemodynamics in acute and chronic pulmonary embolism. *J Nucl Med*. 1997 Jun;38(6):980-3.
 45. Lang IM, Marsh JJ, Olman MA, Moser KM, Schleef RR. Parallel analysis of tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor in plasma and endothelial cells derived from patients with chronic pulmonary thromboemboli. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):706-12.
 46. Olman MA, Marsh JJ, Lang IM, Moser KM, Binder BR, Schleef RR. Endogenous fibrinolytic system in chronic large-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 1992 Oct;86(4):1241-8.
 47. Egermayer P, Peacock AJ. Is pulmonary embolism a common cause of chronic pulmonary hypertension? Limitations of the embolic hypothesis. *Eur Respir J*. 2000 Mar;15(3):440-8.
 48. Franchini M. Hemostatic changes in thyroid diseases: haemostasis and thrombosis. *Hematology*. 2006 Jun;11(3):203-8.

49. Homoncik M, Gessl A, Ferlitsch A, Jilma B, Vierhapper H. Altered platelet plug formation in hyperthyroidism and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Aug;92(8):3006-12.
50. Bick RL. Cancer-associated thrombosis. *N Engl J Med.* 2003 Jul 10;349(2):109-11.
51. Hoepfer MM, Niedermeyer J, Hoffmeyer F, Flemming P, Fabel H. Pulmonary hypertension after splenectomy? *Ann Intern Med.* 1999 Mar 16;130(6):506-9.
52. Morris T, Marsh J, Chiles P, Magana M, Liang N, Soler X, et al. High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood.* 2009 Aug 27;114(9):1929-36.
53. Virchow. Über die standpunkte in des wissenschaftlichen medizin. *Virchows Arch.* 1847;1:1-19.
54. Fadel E, Mazmanian G, Baudet B, Detruit H, Verhoye J, Cron J, et al. Endothelial nitric oxide synthase function in pig lung after chronic pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Oct;162(4 Pt 1):1429-34.
55. Fadel E, Mazmanian G, Chapelier A, Baudet B, Detruit H, de Montpreville V, et al. Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Apr;157(4 Pt 1):1294-300.
56. Fadel E, Michel R, Eddahibi S, Bernatchez R, Mazmanian G, Baudet B, et al. Regression of postobstructive vasculopathy after revascularization of chronically obstructed pulmonary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 Apr;127(4):1009-17.
57. Fadel E, Wijtenburg E, Michel R, Mazoit J, Bernatchez R, Decante B, et al. Regression of the systemic vasculature to the lung after removal of pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Feb 1;173(3):345-9.
58. Michel RP, Hakim TS. Increased resistance in postobstructive pulmonary vasculopathy: structure-function relationships. *J Appl Physiol.* 1991 Aug;71(2):601-10.
59. Michel RP, Hakim TS, Petsikas D. Segmental vascular resistance in postobstructive pulmonary vasculopathy. *J Appl Physiol.* 1990 Sep;69(3):1022-32.
60. Meyrick B, Reid L. The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study. *Lab Invest.* 1978 Feb;38(2):188-200.
61. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Nov;162(5):1932-9.
62. Charan NB, Carvalho P. Angiogenesis in bronchial circulatory system after unilateral pulmonary artery obstruction. *J Appl Physiol.* 1997 Jan;82(1):284-91.
63. Kelly SM, Taylor AE, Michel RP. Bronchial collateral vessel micropuncture pressure in postobstructive pulmonary vasculopathy. *J Appl Physiol.* 1992 Nov;73(5):1914-24.
64. Reid L, Anderson G, Simon G. Comparison of primary and thromboembolic pulmonary hypertension. *Thorax.* 1972 Mar;27(2):263-4.
65. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):731-65.
66. Ghofrani HA, Schermuly RT, Rose F, Wiedemann R, Kohstall MG, Kreckel A, et al. Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Apr 15;167(8):1139-41.
67. Sheth A, Park JE, Ong YE, Ho TB, Madden BP. Early haemodynamic benefit of sildenafil in patients with coexisting chronic thromboembolic pulmonary hypertension and left ventricular dysfunction. *Vascul Pharmacol.* 2005 Jan;42(2):41-5.

68. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993 Jun 17;328(24):1732-9.
69. Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med.* 1995 Sep;99(3):249-54.
70. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1141-50.
71. Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, Fadel E, Fuhrman C, Bugnet AS, et al. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation.* 2003 Oct 14;108(15):1839-44.
72. Koehler R, Olschewski H, Hoepfer M, Janssen B, Grunig E. Serotonin transporter gene polymorphism in a cohort of German patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension or chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest.* 2005 Dec;128(6 Suppl):619S.
73. Ulrich S, Szamalek-Hoegel J, Hersberger M, Fischler M, Garcia JS, Huber LC, et al. Sequence variants in *BMPR2* and genes involved in the serotonin and nitric oxide pathways in idiopathic pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: relation to clinical parameters and comparison with left heart disease. *Respiration.* 2010;79(4):279-87.
74. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1992 Jul 9;327(2):70-5.
75. Bresser P, Fedullo PF, Auger WR, Channick RN, Robbins IM, Kerr KM, et al. Continuous intravenous epoprostenol for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2004 Apr;23(4):595-600.
76. Nagaya N, Sasaki N, Ando M, Ogino H, Sakamaki F, Kyotani S, et al. Prostacyclin therapy before pulmonary thromboendarterectomy in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest.* 2003 Feb;123(2):338-43.
77. Ono F, Nagaya N, Okumura H, Shimizu Y, Kyotani S, Nakanishi N, et al. Effect of orally active prostacyclin analogue on survival in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension without major vessel obstruction. *Chest.* 2003 May;123(5):1583-8.
78. Geraci MW, Moore M, Gesell T, Yeager ME, Alger L, Golpon H, et al. Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. *Circ Res.* 2001 Mar 30;88(6):555-62.
79. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, et al. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation.* 2002 Jan 15;105(2):244-50.
80. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP, Rubin LJ. Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet.* 1998 Mar 7;351(9104):726-7.
81. Weir EK, Olschewski A. Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia. *Cardiovasc Res.* 2006 Sep 1;71(4):630-41.
82. Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, et al. Heterozygous germline mutations in *BMPR2*, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet.* 2000 Sep;26(1):81-4.

83. Botney MD, Bahadori L, Gold LI. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol.* 1994 Feb;144(2):286-95.
84. Morrell NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, et al. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation.* 2001 Aug 14;104(7):790-5.
85. Rabinovitch M. Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension. *Chest.* 1998 Sep;114(3 Suppl):213S-24S.
86. Wigle DA, Thompson KE, Yablonsky S, Zaidi SH, Coulber C, Jones PL, et al. AML1-like transcription factor induces serine elastase activity in ovine pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998 Aug 10;83(3):252-63.
87. Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF, et al. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol.* 1999 Aug;155(2):411-9.
88. Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, et al. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol.* 2001 Oct;195(3):367-74.
89. Wanstall JC, Gambino A, Jeffery TK, Cahill MM, Bellomo D, Hayward NK, et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1;55(2):361-8.
90. Campbell AI, Zhao Y, Sandhu R, Stewart DJ. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2001 Oct 30;104(18):2242-8.
91. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, et al. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J.* 1998 Mar;11(3):554-9.
92. Balasubramaniam V, Le Cras TD, Ivy DD, Grover TR, Kinsella JP, Abman SH. Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 May;284(5):L826-33.
93. Grotendorst GR, Chang T, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR. Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1982 Nov;113(2):261-6.
94. Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2005 Sep 29;353(13):1412-3.
95. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2811-21.
96. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Capel F, Bouchet-Delbos L, et al. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 May 15;165(10):1419-25.
97. Jamieson SW, Auger WR, Fedullo PF, Channick RN, Kriett JM, Tarazi RY, et al. Experience and results with 150 pulmonary thromboendarterectomy operations over a 29-month period. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Jul;106(1):116-26; discussion 26-7.

98. Peacock A, Simonneau G, Rubin L. Controversies, uncertainties and future research on the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Sep;3(7):608-14.
99. Rendas A, Lennox S, Reid L. Aorta-pulmonary shunts in growing pigs. Functional and structural assessment of the changes in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1979 Jan;77(1):109-18.
100. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2004 Sep 30;351(14):1425-36.
101. Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003 Jun;81(6):542-54.
102. Thistlethwaite PA, Lee SH, Du LL, Wolf PL, Sullivan C, Pradhan S, et al. Human angiopoietin gene expression is a marker for severity of pulmonary hypertension in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Jul;122(1):65-73.
103. Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 2006 Jan-Mar;10(1):45-55.
104. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998 Jan 15;12(2):149-62.
105. Compernelle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, et al. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovasc Res.* 2003 Dec 1;60(3):569-79.
106. Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, et al. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004 Jul 23;95(2):146-53.
107. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):653-60.
108. Fagan KA, Morrissey B, Fouty BW, Sato K, Harral JW, Morris KG, Jr., et al. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res.* 2001;2(5):306-13.
109. Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol.* 1996 Jan;270(1 Pt 1):L164-70.
110. Xue C, Rengasamy A, Le Cras TD, Koberna PA, Dailey GC, Johns RA. Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol.* 1994 Dec;267(6 Pt 1):L667-78.
111. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995 Jul 6;376(6535):70-4.
112. Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC. Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12171-80.
113. Shyu KG. Enhancement of new vessel formation by angiopoietin-2/Tie2 signaling in endothelial progenitor cells: a new hope for future therapy? *Cardiovasc Res.* 2006 Dec 1;72(3):359-60.
114. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997 Jul 4;277(5322):55-60.

115. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*. 2003 Nov 28;93(11):1074-81.
116. Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, et al. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2004 Nov;6(5):485-95.
117. Licht AH, Muller-Holtkamp F, Flamme I, Breier G. Inhibition of hypoxia-inducible factor activity in endothelial cells disrupts embryonic cardiovascular development. *Blood*. 2006 Jan 15;107(2):584-90.
118. Brusselmans K, Compennolle V, Tjwa M, Wiesener MS, Maxwell PH, Collen D, et al. Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest*. 2003 May;111(10):1519-27.
119. Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(5):691-6.
120. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 1;61(2):227-37.
121. Ivy DD, Yanagisawa M, Garipey CE, Gebb SA, Colvin KL, McMurtry IF. Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Apr;282(4):L703-12.
122. Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res*. 2006 Jun 23;98(12):1528-37.
123. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999 Aug 15;59(16):3915-8.
124. Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol*. 1995 Jun;268(6 Pt 1):C1362-8.
125. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9;92(10):4606-10.