



HAL
open science

**Potentiel de la formulation EPA/DHA 6/1 à prévenir la
dysfonction endothéliale et le remodelage
cardiopulmonaire dans l'hypertension artérielle
pulmonaire chez le rat**

Said Amissi

► **To cite this version:**

Said Amissi. Potentiel de la formulation EPA/DHA 6/1 à prévenir la dysfonction endothéliale et le remodelage cardiopulmonaire dans l'hypertension artérielle pulmonaire chez le rat. Pharmacologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ048 . tel-01561177

HAL Id: tel-01561177

<https://theses.hal.science/tel-01561177>

Submitted on 12 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE 414-Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

CNRS UMR 7213 Faculté de Pharmacie

THÈSE présentée par :

Said AMISSI

soutenue le : 19 septembre 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Pharmacologie Préclinique et Clinique**

**Potentiel de la formulation EPA:DHA 6:1
à prévenir la dysfonction endothéliale et
le remodelage cardiopulmonaire dans
l'hypertension artérielle pulmonaire
chez le rat**

THÈSE dirigée par :

Mme SCHINI-KERTH Valérie B Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr PLOTKINE Michel Professeur, Paris Descartes

Mme VERGELY Catherine Professeur, Université de Bourgogne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr MEZIANI Ferhat Professeur, Université de Strasbourg

Mr MONTANI David Docteur, Hôpital de Bicêtre et Université Paris Sud

Mr LESSINGER Jean-Marc Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères :

Au **Professeur Valérie SCHINI-KERTH**, ma directrice de thèse, pour m'avoir guidé dans l'élaboration de ce travail, encouragée et soutenue tout au long de la thèse avec patience et disponibilité, et pour la confiance qu'elle m'a accordée.

Au **Professeur Ferhat MEZIANI**, mon co-directeur de thèse, pour son soutien, sa confiance et ses encouragements permanents.

Je remercie très chaleureusement le **Professeur Michel PLOTKINE** et le **Professeur Catherine VERGELY** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Votre présence dans le jury est un honneur pour moi.

Je tiens également à remercier le **Professeur Jean-Marc LESSINGER** et le **Docteur David MONTANI** de me faire l'honneur d'examiner ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je dois aussi un grand merci au **Professeur Nelly Bohem** et au **Professeur Laurent Monassier**, qui m'ont apporté leur collaboration et leur transmission de savoir-faire. Qu'il retrouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je remercie aussi le professeur **Florence Toti** et le **Docteur Cyril AUGER** pour leur disponibilité, leur sympathie et leur transmission de savoir.

Merci également aux chercheurs et personnels techniques du laboratoire, et plus particulièrement au docteur **Philippe CHABERT**, **Mélanie Burban** et **Brigitte POLLET**, pour leurs aides et leur conseils toujours très pertinents.

Mes remerciements vont aussi à **toutes les personnes du laboratoire de Valérie et de l'UMR 7213, Laboratoire Biophotonique et Pharmacologie**.

J'adresse enfin mes plus tendres remerciements à ma chère épouse, **Faouzia**, à mes garçons **Yassine** et **Yazid**, et à **ma famille**. Leur présence inconditionnelle a fait de moi la personne que je suis devenue.

Publications et communications scientifiques

I. Publications

1. Articles originaux

Said Amissi, Zahid Rasul Niazi, Mélanie Burban, Romain Kessler, Mathieu Canuet, Florence Toti, Laurent Monassier, Nelly Boehm, Cyril Auger, Ferhat Meziani and Valérie B. Schini-Kerth. The omega-3 EPA:DHA 6:1 product prevents the monocrotaline-induced cardiopulmonary altered function and remodeling in rats. En préparation pour une soumission à FASEB Journal, 2016.

Said Amissi*, **Julie Boisramé-Helms***, Mélanie Burban, Sherzad K. Rashid, Antonio J León-González, Cyril Auger, Florence Toti, Ferhat Meziani and Valérie B Schini-Kerth. Potential of lipid emulsions used in parenteral nutrition to induce endothelial dysfunction in porcine coronary artery rings: Role of oxidative stress and cyclooxygenase-derived vasoconstrictors. (*Lipids, en révision, 2016*). Premier co-auteur

Julie Boisramé-Helms*, **Said Amissi***, Mélanie Burban, Xavier Delabranche, Laure Stiel, Fatiha Zobairi, Michel Hasselmann, Valérie Schini-Kerth, Florence Toti, Ferhat Meziani. Medium-chain triglyceride supplementation exacerbates peritonitis-induced septic shock in rats: role on cell membrane remodeling. *Shock*. 2014 ; 42(6):548-53. Premier co-auteur

2. Revue

Cyril Auger, **Said Amissi**, Phuong Nga Nguyen, Philippe Chabert, Nouredine Idris-Khodja, Valérie B. Schini-Kerth. Potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2016, 68 :11-8

II. Participation à des réunions scientifiques

1. Communication orale

Said Amissi, Zahid Rasul Niazi, Mélanie Burban, Romain Kessler, Mathieu Canuet, Florence Toti, Laurent Monassier, Nelly Boehm, Cyril Auger, Ferhat Meziani and Valérie B. Schini-Kerth. The optimized omega-3 EPA:DHA 6:1 formulation prevents endothelial dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. Journées du Campus d'Illkirch, 21-22 avril 2016, Illkirch, France.

Said Amissi, Zahid Rasul Niazi, Mélanie Burban, Romain Kessler, Mathieu Canuet, Florence Toti, Laurent Monassier, Nelly Boehm, Cyril Auger, Ferhat Meziani and Valérie B. Schini-Kerth. The optimized omega-3 EPA:DHA 6:1 product prevents the monocrotaline-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, pulmonary endothelial dysfunction and vascular remodeling in rats. Congrès de Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, 19-21 avril 2016, Nancy, France.

2. Communications affichées

Said Amissi, Zahid Rasul Niazi, Mélanie Burban, Romain Kessler, Mathieu Canuet, Florence Toti, Laurent Monassier, Nelly Boehm, Cyril Auger, Ferhat Meziani and Valérie B. Schini-Kerth. The optimized omega-3 EPA:DHA 6:1 product prevents the monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. Printemps de la Cardiologie-Recherche fondamentale et Clinique, 7-8 avril 2016, Dijon, France.

Said Amissi, Julie Boisramé-Helms, Mélanie Burban, Sherzad Rashid, Cyril Auger, Florence Toti, Ferhat Meziani, Valérie B Schini-Kerth. Lipid emulsions used in parenteral nutrition induced endothelial dysfunction in porcine coronary artery rings involves oxidative stress and cyclooxygenase-derived vasoconstrictors. Journées du Campus d'Illkirch, 13-14 avril 2015, Illkirch, France.

Said Amissi, Julie Boisramé-Helms, Mélanie Burban, Sherzad Rashid, Cyril Auger, Florence Toti, Ferhat Meziani, Valérie B Schini-Kerth. Lipid emulsions used in parenteral nutrition induce endothelial dysfunction in porcine coronary artery rings: Role of oxidative stress and cyclooxygenase-derived vasoconstrictors. Printemps de la Cardiologie-Recherche fondamentale et Clinique. 24-25 avril 2014, Strasbourg, France.

Said Amissi, Mélanie Burban, Sherzad Rashid, Julie Boisramé-Helms, Cyril Auger, Florence Toti, Ferhat Meziani, Valérie B Schini-Kerth. Lipid emulsions used in parenteral nutrition induce endothelial dysfunction in isolated porcine coronary arteries: Role of oxidative stress. IX^{ème} Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, 22-24 avril 2014, Poitiers, France.

Said Amissi, Cyril Auger, Julie Boisramé-Helms, Florence Toti, Ferhat Meziani, Valérie B Schini-Kerth. Medium-chain triglycerides used in parenteral nutrition are able to induce endothelial dysfunction in isolated porcine coronary arteries. Journées du Campus d'Illkirch, 4-5 avril 2013, Illkirch, France.

Citation

"Ce que signifie le mot recherche ? Vivre pleinement la question"

Edgar Morin (1921-)

TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS	9
RÉSUMÉ.....	11
INTRODUCTION.....	17
Chapitre I : Impact de la formulation EPA:DHA 6:1 dans l'HTAP	20
1. Hypertension artérielle pulmonaire	20
1.1. Définition	20
1.2. Symptômes.....	21
1.3. Classification.....	21
1.4. Epidémiologie de l'HTAP	22
1.5. La circulation pulmonaire	25
2. Anato-pathologie de l'HTAP	28
3. Physiopathologie de l'HTAP.....	31
3.1. Dysfonction endothéliale pulmonaire dans l'HTAP.....	32
3.2. Inflammation et HTAP.....	40
3.3. Stress oxydant et HTAP	41
4. Répercussion du cœur droit dans l'HTAP.....	44
4.1. Physiologie du cœur droit	44
4.2. Conséquences sur le cœur droit	46
5. Diagnostic de l'HTAP	49
5.1. Echographie cardiaque transthoracique	50
5.2. Cathétérisme cardiaque droit	51

5.3. Evaluation de la sévérité	51
6. Prise en charge actuelle des patients HTAP	52
6.1. Traitements conventionnels	52
6.2. Traitements spécifiques.....	54
6.3. Transplantation cardiaque/cardiopulmonaire.....	58
7. Modèles animaux d'HTAP	59
7.1. HTAP induite par la monocrotaline	59
7.2. HTAP induite par une hypoxie chronique chez les rongeurs.....	62
7.3. Modèle d'HTAP induite par le Sugén 5416/Hypoxie (SuHx).....	62
7.4. Modèles animaux d'HTAP sur shunt.....	63
7.5. Animaux Transgéniques et HTAP	64
7.6. Modèle in vitro.....	65
8. Impacts des oméga-3 dans l'HTAP	66
8.1. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3 (AGPI n-3)	66
8.2. Structure et métabolisme des acides gras polyinsaturés	66
8.3. Voie de signalisation des oméga-3.....	68
8.4. Oméga-3 et les maladies cardiovasculaires	69
8.5. Oméga-3 et HTAP	71
Chapitre II. Emulsions lipidiques et fonction endothéliale	72
1. Acides gras	72
2. Indication des différentes émulsions lipidiques.....	72
3. Concept des émulsions lipidiques.....	73
4. Controverse des émulsions lipidiques	73
5. Intérêt des oméga-3 dans la nutrition parentérale.....	74

OBJECTIF DES ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	75
1. Hypothèse	75
2. Objectif du projet.....	75
MATERIELS ET METHODES	76
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	85
Article 1	85
Article 2.....	125
DISCUSSION GÉNÉRALE	159
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	174
ANNEXES	177
Article 3	177
Article 4.....	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	180

Listes des figures

Figure 1 : Circulation pulmonaire et circulation systémique	26
Figure 2 : Structure d'artère et de veine pulmonaire.....	28
Figure 3 : Remodelages de la paroi artérielle conduisant à l'HTAP.....	29
Figure 4 : Voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP.....	31
Figure 5 : Rôle du monoxyde d'azote dans la vasodilatation de l'artère pulmonaire.....	33
Figure 6 : Synthèse des prostaglandines (PG) et thromboxane A2 (TXA ₂).....	35
Figure 7 : Régulation de la synthèse de l'endothéline-1	37
Figure 8 : Dysfonctions des cellules musculaires lisses conduisant à l'HTAP.....	39
Figure 9 : Principaux médiateurs inflammatoires dans le remodelage vasculaire.	40
Figure 10 : Monoxyde d'azote, inflammation et stress oxydant dans l'HTAP.....	42
Figure 11 : NADPH oxydase, source majoritaires des espèces réactives de l'oxygène	43
Figure 12 : Macroscopie du ventricule droit en coupe sagittale	45
Figure 13 : Représentation schématique du remodelage morphologique du ventricule droit..	49
Figure 14 : Principales cibles thérapeutiques dans l'HTAP.....	55
Figure 15 : La plante <i>Crotalaria spectabilis</i> et la molécule de monocrotaline	60
Figure 16 : La monocrotaline induit une HTAP chez le rat	61
Figure 17 : Comparaison du remodelage des artères pulmonaire	63
Figure 18 : Structure des acides gras polyinsaturés (PUFA)	66
Figure 19 : Voies métaboliques des oméga-6 et oméga-3	67
Figure 20 : Voie de signalisations moléculaires de l'EPA et du DHA.	68
Figure 22 : Protocole expérimental de l'HTAP induite par la MCT chez le rat	76
Figure 23 : Représentation et fonctionnement des chambres à organes isolés	83

ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ACh	Acétylcholine
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse de variance
AT1R	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bone morphogenetic proteinsProtéine osseuse morphogénétique
CaM	Calmoduline
Cav-1	Cavéoline 1
CE	Cellules endothéliales
CML	Cellules musculaires lisses
COX	Cyclooxygénase
CTX	Charybdotoxine
CYP450 :	Cytochrome P450
DAG	Diacylglycérol
DHA	Acide docosaénoïque ou C22:6 n-3
EDCFs	Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium
EDH	Hyperpolarisation dépendante de l'endothélium
eNOS	NO synthase endothéliale (endothelial Nitric Oxyde Synthase)
EPA	Acide eicosapentaénoïque ou C20:5 n-3
ET-1	Endothéline-1
ET _{A/B}	Récepteur de l'endothéline-1 de type A et B
FAC	Fraction de raccourcissement de surfaceVD
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HTP	Hypertension pulmonaire
IT	Insuffisance tricuspide
ITV	Intégrale temps vitesse
K _v	Canaux potassiques voltage-dépendants

LOX	Lipoxygénase
LT	Leucotriène
MCT	Monocrotaline
MEC	Matrice extracellulaire
MLC	Chaînes légères de la myosine
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NYAH	New York Heart Association
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
PAAT	Temps d'accélération de l'artère pulmonaire
PAP	Pression artérielle pulmonaire
PDE-5	Phosphodiesterase de type 5
PG	Prostaglandine
PGI ₂	Prostacycline
PHE	Phényléphrine
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PKA/PKB/ PKG	Protéine kinase A/B/G
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RVP	Résistance vasculaire pulmonaire
RVSP	Pression systolique du ventricule droit
sGC	Guanylyl cyclase soluble
SOD	Superoxyde dismutase
TCL	Triglycérides à chaînes longues
TCM	Triglycérides à chaînes moyennes
TGF-β	Facteur de croissance transformant -β
TNF-α	Facteur de nécrose tumoral α (Tumor Necrosis Factor-α)
U46619	Analogue de la thromboxane A ₂
VD	Ventricule droit
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VG	Ventricule gauche

Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une pathologie affectant principalement les artères pulmonaires de petit calibre entraînant une augmentation des résistances artérielles pulmonaires aboutissant à une défaillance cardiaque droite. La vasoconstriction, le remodelage pariétal et la thrombose au niveau des artères pulmonaires distales sont de facteurs qui contribuent au développement et à la progression de la pathogénèse de l'HTAP. La dysfonction endothéliale, définie comme étant la perte d'un équilibre entre les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs, est un événement précoce dans l'initiation et le développement de l'HTAP.

Dans les conditions physiologiques normales, l'endothélium vasculaire joue un rôle déterminant dans la régulation de l'homéostasie vasculaire pulmonaire principalement en libérant de puissants facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI₂). Par le biais de ces facteurs, les cellules endothéliales (CE) maintiennent une surface non thrombogène pour le flux sanguin pulmonaire, inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) dans la paroi vasculaire pulmonaire, régulent la réponse inflammatoire, et permettent la vasodilatation.

Dans les conditions pathologiques comme l'HTAP, le dysfonctionnement des CE entraîne une augmentation des facteurs vasoconstricteurs et mitogéniques comme l'endothéline-1 (ET-1) et le thromboxane A₂ (TXA₂). Ces facteurs activent l'adhésion des plaquettes et des monocytes, la prolifération des CML vasculaires pulmonaires et conduisent à un intense remodelage artériel pulmonaire par épaissement de la paroi vasculaire pulmonaire. Le stress oxydant, les médiateurs inflammatoires et les facteurs de croissance sont des acteurs majeurs favorisant le développement de la dysfonction endothéliale et le remodelage artériel pulmonaire dans l'HTAP.

Les progrès énormes réalisés au cours de ces dernières années concernant les thérapeutiques médicamenteuses (les antagonistes des récepteurs de ET-1, les analogues de la PGI₂ et les inhibiteurs de phosphodiesterase 5) n'ont pas permis hélas d'améliorer significativement la survie des patients atteints d'HTAP. Cette maladie restant incurable, la transplantation cardio-pulmonaire ou bi-pulmonaire est alors la seule alternative pour prolonger la survie des patients atteints d'HTAP.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux propriétés des acides gras oméga-3 pour leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé et en particulier sur la réduction de la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires, afin d'évaluer leurs potentiels à prévenir l'HTAP. En effet, de nombreuses études épidémiologiques et interventionnelles montrent que la consommation régulière d'acides gras oméga-3 tels que les acides eicosapentaénoïque (EPA, C20:5n-3) et docosahexaénoïque (DHA, C22:6n-3), présents en grande quantité dans les huiles de poissons gras, réduisent l'hypertension artérielle, les réponses pro-inflammatoires, les risques d'arythmie cardiaque, protègent les LDL contre l'oxydation pour retarder le développement de l'athérosclérose, réduisent le stress oxydant, inhibent l'agrégation plaquettaire et protègent la fonction endothéliale en augmentant la disponibilité du NO. De plus, les récents travaux de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence les effets directs de différentes formulations EPA:DHA sur des coronaires isolées de porc et des cellules endothéliales de ces mêmes vaisseaux. Le rapport EPA:DHA 6:1 a démontré une supériorité de sa capacité à induire des relaxations dépendantes de l'endothélium en stimulant la formation du NO, suite à l'activation redox-sensible de la voie PI3-Kinase/Akt menant à l'augmentation de l'activité de la NO synthase endothéliale par phosphorylation du site activateur Ser 1177.

Les effets vasculaires pulmonaires des oméga-3 sont peu étudiés. A notre connaissance, nous étudions pour la première fois l'intérêt de la formulation EPA:DHA 6:1 dans l'HTAP. Ce travail a pour objectif d'étudier les potentiels de la formulation EPA:DHA 6:1 à prévenir les altérations cardiovasculaires et pulmonaires induites par l'injection de monocrotaline (MCT) dans un modèle expérimental d'HTAP chez le rat Wistar.

Nos résultats expérimentaux montrent qu'après 21 jours suivant l'injection de MCT, les rats présentaient une forte augmentation significative de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) corrélée à une augmentation de la pression systolique du ventricule droit (RVSP) et une diminution du débit cardiaque (CO). Les tests fonctionnels et histologiques révèlent que la MCT induisait une augmentation significative des résistances vasculaires pulmonaire (RVP), une hypertrophie de la paroi des artérioles pulmonaires, une dilatation et une hypertrophie significative du ventricule droit (VD). Les analyses en immunohistochimie et immunofluorescence montrent une infiltration de macrophages et de lymphocytes T sur la paroi des artérioles pulmonaires et au niveau des cardiomyocytes du VD, une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une surexpression de la NADPH oxydase (p22^{phox} et p47^{phox}), des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2), de la eNOS découplée, et des récepteurs de l'ET-1 (ET_A, ET_B) et de l'angiotensine-II (AT1R).

Le traitement oral pendant 4 semaines des rats HTAP avec la formulation EPA:DHA 6:1 exerce un effet favorable sur ces différentes modifications et une activité préventive du développement de l'HTAP dans ce modèle de rat. L'EPA:DHA 6:1 prévient l'élévation de la PAPm, la RVSP, la dysfonction endothéliale et réduit significativement le remodelage artériolaire pulmonaire, les infiltrats périvasculaires artériolaires de lymphocytes et de macrophages, l'hypertrophie et la dilatation du VD. De plus, le traitement avec EPA:DHA 6:1 inhibe la production des ROS suggérant le rôle du stress oxydant dans les effets cardiovasculaires délétères de l'HTAP. Ce traitement entraîne également une diminution de la surexpression de la sous-unité p22^{phox} et p47^{phox} de la NADPH oxydase, la eNOS découplée, les COX-1 et COX-2 et les ET_A et ET_B.

En conclusion, l'ensemble des données montre que le traitement *per os* avec EPA:DHA 6:1 prévient le développement de l'HTAP par une atténuation des réponses inflammatoires et du stress oxydant, une inhibition du remodelage des artérioles pulmonaires et du ventricule droit, et une amélioration de la fonction endothéliale pulmonaire.

La seconde partie de mon travail traite les impacts des émulsions lipidiques utilisées en nutrition parentérale humaine sur la fonction endothéliale dans un modèle de vaisseaux sanguin isolés. En effet, les émulsions lipidiques permettent un apport énergétique dérivé des acides gras lorsque la nutrition orale ou entérale est insuffisante ou contre-indiquée. Bien qu'améliorant le statut nutritionnel du patient, l'apport d'acides gras peut induire une dysfonction endothéliale laquelle peut favoriser le développement de pathologies cardiovasculaires comme l'athérombose. Les émulsions lipidiques en nutrition parentérale sont connues pour moduler la fonction endothéliale selon la nature des acides gras (AG) qui les composent, en modifiant notamment le profil phospholipidique des membranes cellulaires, en augmentant la production de ROS et en induisant une élévation de médiateurs pro-inflammatoires. Ainsi, un apport élevé en acide linoléique (C18:2n-6), précurseur de l'acide arachidonique, oriente préférentiellement la synthèse des eicosanoïdes vers les dérivés prostanoïdes vasoconstricteurs et pro-inflammatoires, alors qu'un apport en acides gras polyinsaturés n-3, EPA, DHA, l'oriente vers des dérivés moins délétères et moins pro-inflammatoires.

L'objectif de ce travail était d'apprécier, dans un modèle de vaisseau sanguin isolé, les voies biochimiques impliquées dans l'altération de la fonction endothéliale induite par différentes émulsions lipidiques nutritionnelles et de déterminer si l'ajout d'oméga-3 aux émulsions lipidiques est capable de protéger la fonction endothéliale vis-à-vis de leurs effets délétères.

Nos résultats expérimentaux indiquent que l'incubation d'anneaux d'artère coronaire de porc avec différentes formulations d'émulsions lipidiques comme le Lipidem[®], le Médialipide[®] ou le SMOFlipide[®] entraîne une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium en réponse à la bradykinine, indiquant l'induction d'une dysfonction endothéliale. Cette dysfonction endothéliale est en partie associée à une diminution des composantes NO et EDH de la relaxation et à une augmentation des prostanoïdes vasoconstricteurs. Bien que les mécanismes responsables de l'altération de la fonction endothéliale soient mal connus, nos travaux soulignent l'importance du stress oxydant dans le développement de la dysfonction endothéliale induite par les émulsions lipidiques. De plus, les acides gras polyinsaturés (oméga-3) ont montré un effet protecteur vis-à-vis de la fonction endothéliale en augmentant la formation de facteurs vasoprotecteurs NO et EDH. De ce fait, il est vraisemblable que la présence d'acides gras oméga-3 dans les émulsions lipidiques pourrait non seulement permettre un apport énergétique mais aussi protéger la fonction endothéliale du patient.

En conclusion, la formulation d'oméga-3 dans un rapport EPA:DHA 6:1 possède des effets vasoprotecteurs *in vitro* et *in vivo* en prévenant la dysfonction endothéliale associée à l'HTAP et induite par les émulsions lipidiques de nutrition parentérale. La protection de la fonction endothéliale par les oméga-3 EPA:DHA 6:1 se manifeste par une augmentation de la formation de facteurs vasorelaxants NO et EDH, et par une diminution de facteurs vasoconstricteurs et mitogéniques endothéliaux. Ces effets protecteurs impliquent *in vivo* une diminution du remodelage vasculaire cardiopulmonaire, une diminution du stress oxydant et une inhibition des réponses inflammatoires dans la paroi artérielle. Les résultats de ce travail de recherche sont en accord avec les données cliniques indiquant que la consommation régulière des poissons gras riches en oméga-3 diminue le risque cardiovasculaire. De plus, ils suggèrent que la formulation d'oméga-3 EPA:DHA 6:1 pourrait contribuer à protéger la fonction endothéliale dans l'HTAP et dans la nutrition parentérale impliquant certaines émulsions lipidiques.

Pulmonary arterial hypertension is a rare disease of the small pulmonary arteries characterized by an important vascular proliferation and remodeling. It results in a progressive increase in pulmonary vascular resistance and, ultimately, right ventricular failure and death. Despite recent major improvements in symptomatic treatments, no current treatment is able to cure the patients for the long term. Pulmonary arterial proliferation and remodeling, endothelial dysfunction, inflammation and oxidative stress promote the development of pulmonary hypertension. Omega-3 polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA) have been shown to protect the cardiovascular system and reduce inflammation and oxidative stress. Polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) that exerts anti-oxidant and anti-inflammatory protective effects in the systemic circulation, but its effects on pulmonary arteries remain poorly defined. Few studies have been shown that EPA and DHA reduce inflammation and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells under pathophysiological conditions.

The possibility that EPA:DHA 6:1 a superior omega-3 formulation prevents pulmonary arterial and right ventricular remodeling and dysfunction was evaluated an experimental model PAH. We hypothesize that metabolites from Oméga-3 could resolve inflammation and potentially prevent endothelial dysfunction and cardiopulmonary remodeling in experimental PAH. In the present study, we used a well-known *in vivo* model of monocrotaline-induced PAH in rats, treated with EPA:DHA 6:1 to evaluate the potential of this formulation to prevent PAH.

Results show that MCT treatment was associated in the pulmonary artery with a significant increased mean pulmonary arterial pressure (mPAP), vascular resistance, and blunted endothelium-dependent relaxations to acetylcholine, in pulmonary arterioles with increased wall thickness and oxidative stress, and in the heart with increased RV systolic pressure (RVSP), RV hypertrophy and a reduced cardiac output (CO). Compared to the MCT group, the EPA:DHA 6:1 treatment for 3 weeks following MCT injection significantly prevented the MCT-induced changes in the morphology and pressure in the pulmonary artery and the RV, and also prevented the decreased CO. EPA:DHA 6:1 treatment resulted in a significant improvement of right ventricular hypertrophy by reducing Fulton's index. Morphometric analyses revealed that the wall thickness of pulmonary arterioles was significantly lower in MCT + EPA:DHA 6:1-treated rats compared with controls. EPA:DHA

6:1 treatment significantly reduced MCT-induced vascular oxidative stress and improved endothelial function in pulmonary arteries. The protective effect of EPA:DHA 6:1 was associated with the prevention of the MCT-induced upregulation of NADPH oxidase subunits (p22^{phox} and p47^{phox}), COX-1 and COX-2, endothelin A and B receptors and uncoupled eNOS in pulmonary arterioles and a reduced pulmonary infiltration of macrophages and lymphocytes. The MCT-induced vascular oxidative stress was significantly reduced by N-acetylcysteine, VAS-2870, N^G-nitro-L-arginine and indomethacin.

In conclusion, the present findings indicate that the EPA:DHA 6:1 formulation has a vascular effect in PAH by preventing RV failure, pulmonary arterioles remodeling and dysfunction, inhibit inflammation status, most likely by preventing the NADPH oxidase, COX and uncoupled eNOS-mediated vascular oxidative stress to prevent and potentially cure pulmonary hypertension induced by MCT. Our studies show that the EPA:DHA 6:1 formulation exerts anti-inflammatory, anti-oxidant and has a protective vascular effect in the pulmonary arteries, which may contribute to prevent and potentially cure pulmonary hypertension induced by MCT in rat.

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires par athérosclérose représentent la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés avec plus de 17 millions de décès par an, soit 30 % du total dans le monde (OMS¹). L'évolution de l'athérosclérose dépend de nombreux facteurs, mais les plus importants sont l'augmentation du taux de cholestérol dans le sang et l'hypertension artérielle.

Au cours de ce travail, nous avons, dans **un premier temps**, étudié l'impact de la formulation optimisée en oméga-3 EPA:DHA 6:1 dans la résolution de la dysfonction endothéliale, l'inflammation et le stress oxydant pour prévenir l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).

L'HTAP est une pathologie engageant le pronostic vital en aboutissant à une défaillance cardiaque droite. Elle est définie par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos associée à une pression pré-capillaire pulmonaire normale (PCP \leq 15 mmHg) (Galiè et al., 2009; Montani et al., 2013). Cette augmentation de la PAPm est secondaire à plusieurs mécanismes associant à des degrés variables une vasoconstriction, un remodelage prolifératif de toutes les couches de la paroi vasculaire et une oblitération thrombotique des artères pulmonaires de petit calibre (Humbert et al., 2004). Le principal symptôme est l'intolérance à l'effort sous la forme de dyspnée accompagnée le plus souvent à des douleurs thoraciques et à la fatigue musculaire chronique.

Le développement de l'HTAP implique le système cardiaque, pulmonaire et vasculaire. En effet, l'HTAP est une maladie rare mais n'est pas orpheline car il existe des progrès thérapeutiques considérables dans la prise en charge des patients atteints d'HTAP grâce au développement de nouveaux traitements pharmacologiques ciblant la dysfonction endothéliale, caractérisée par une biodisponibilité réduite de la prostacycline (PGI₂) et du monoxyde d'azote (NO) et à une surproduction de l'endothéline-1 (ET-1). On distingue les analogues de la PGI₂ (époprosténol, tréprostinil), les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 (sildénafil et tadalafil) et les antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1 (bosentan et

¹ Organisation Mondiale de la Santé : Projet Monica (Multinational **MONI**toring of trends and determinants in **C**ardiovascular disease)

ambrisentan). En dépit de progrès thérapeutiques au cours des dernières années, la survie des patients n'a été réellement améliorée. Les traitements actuels ne permettent pas de guérir cette maladie grave. L'HTAP demeure pourtant une maladie incurable dont la survie est de seulement 50 % à 5 ans (McLaughlin et al., 2015). La transplantation cardio-pulmonaire reste la seule alternative pour prolonger la survie des patients.

Les patients souffrant d'HTAP présentent une morbi-mortalité élevée principalement d'origine cardiovasculaire. En effet, il est aujourd'hui établi qu'une dysfonction endothéliale constitue un élément majeur de la pathogénèse de l'HTAP. La dysfonction endothéliale pulmonaire est associée à l'inflammation et au stress oxydant vasculaire dès le stade précoce de la maladie (Crosswhite and Sun, 2010).

L'altération du métabolisme énergétique joue un rôle important dans l'évolution de la pathologie. Pourtant peu d'études se sont intéressées au métabolisme lipidique pour une approche thérapeutique du remodelage artériel et de l'insuffisance cardiaque dans l'HTAP. En modulant la composition et la structure des membranes cellulaires ainsi que les fonctions cellulaires et la synthèse de médiateurs lipidiques comme les eicosanoïdes, un complément alimentaire en acides gras polyinsaturés de type oméga-3 pourrait être bénéfique chez les patients atteints d'HTAP.

De nombreuses études indiquent que la consommation régulière d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes n-3 (EPA, DHA) réduit l'apparition de pathologies cardiovasculaires (athérome, infarctus du myocarde, hypertension artérielle) (Cottin et al., 2011; Degirolamo et al., 2010; Shimokawa et al., 1988). Les oméga-3 exercent des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antiprolifératifs et vasodilatateurs sur le système vasculaire (Kromhout et al., 2012; Shimokawa et al., 1988). Les données les plus récentes de notre laboratoire montrent la supériorité de la formulation EPA:DHA 6:1 à stimuler la production par l'endothélium du monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de la prolifération cellulaire, de l'agrégation plaquettaire et des réponses pro-inflammatoires permettant ainsi de penser que les oméga-3 pourraient avoir un effet bénéfique chez les patients atteints d'HTAP par une amélioration de la fonction endothéliale.

Au cours de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'intérêt de la formulation en oméga-3 EPA:DHA 6:1 à prévenir l'élévation de la pression artérielle pulmonaire, les altérations cardiovasculaires et pulmonaires et l'hypertrophie et l'insuffisance

ventriculaire droite induite par l'injection de MCT dans un modèle HTAP expérimentale chez le rat.

Dans **un second temps**, nous avons étudié la capacité de la formulation EPA:DHA 6:1 à réduire la dysfonction endothéliale induite par les émulsions lipidiques utilisées en nutrition parentérale, et à préciser le mécanisme lié en particulier au stress oxydant et aux prostanoïdes vasoconstricteurs. En effet, en nutrition parentérale, les émulsions lipidiques permettent un apport énergétique dérivé des acides gras au patient lorsque la nutrition orale ou entérale est insuffisante ou contre-indiquée (Boisrame-Helms et al., 2015). Bien qu'améliorant le statut énergétique du patient, l'apport d'acides gras peut entraîner l'induction d'une dysfonction endothéliale, qui peut favoriser le développement de pathologies cardiovasculaires comme l'athéromatose (Steer et al., 2003).

L'objectif de ce projet est d'étudier, dans un modèle d'artère coronaire de porc les mécanismes responsables de l'altération de la fonction endothéliale par les émulsions lipidiques en mettant en évidence le rôle du stress oxydant et des prostanoïdes vasoconstricteurs, et de déterminer si les oméga-3 sont capables de protéger la fonction endothéliale vis-à-vis des effets délétères des émulsions riches en acides gras.

Chapitre I : Impact de la formulation EPA:DHA 6:1 dans l'HTAP

1. Hypertension artérielle pulmonaire

1.1. Définition

L'hypertension pulmonaire que l'on appelle aussi HTAP est une maladie rare engageant le pronostic vital du patient. Cette pathologie vasculaire pulmonaire est caractérisée par un intense remodelage et obstructif des artères pulmonaires de petit calibre (< 500 µm de diamètre), conduisant à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (Simonneau et al., 2013). Ce qui oblige le cœur droit à travailler davantage pour pomper le sang veineux, pauvre en oxygène vers les poumons. Le cœur droit finit par s'hypertrophier et se dilater suite à un mécanisme d'adaptation à l'augmentation de la post-charge aboutissant à une défaillance ventriculaire droite et à terme au décès du patient par arrêt cardiaque. Il s'agit d'une élévation anormale des résistances vasculaires qui s'opposent à l'écoulement du sang, accompagnées par un rétrécissement du diamètre de la lumière des vaisseaux sanguins pulmonaires (Montani et al., 2013). L'HTAP est caractérisée du point de vue hémodynamique par une élévation de la PAPm supérieure à 25 mmHg associée à une pression capillaire pulmonaire (PCP) inférieure à 15 mmHg (téléexpiratoire) et des RVP supérieures à 3 unités Wood au moment du cathétérisme cardiaque droit au repos (Seferian et al., 2014).

La PAPm est dépendante de la PCP, du débit sanguin pulmonaire (Q) et de la RVP selon la formule suivante :

$$\text{PAPm} = \text{PCP} + (\text{Q} \times \text{RVP})$$

Equation 1 : La pression artérielle pulmonaire moyenne

En l'absence d'anomalies et en condition normoxique, la PAPm est de l'ordre de 14 ± 3 mmHg.

1.2. Symptômes

Chez les patients, la maladie se manifeste par divers symptômes comme de l'essoufflement, car la ventilation est perturbée par l'obstruction des vaisseaux. Des douleurs thoraciques peuvent être ressenties du fait des difficultés à l'écoulement du sang, et les échanges gazeux se font moins facilement ce qui provoque des carences en oxygène appelées hypoxies, qui peuvent causer des étourdissements et des pertes de connaissance fréquentes. Généralement, la fatigue musculaire chronique se fait ressentir chez les patients rendant alors difficiles les activités quotidiennes normales (Scarlett et al., 2009). Les symptômes de l'HTAP sont aspécifiques et surviennent typiquement à l'effort incluant dyspnée, asthénie, syncope, angine de poitrine et toux. La rétention hydrique, en particulier l'ascite et les œdèmes des membres inférieurs apparaissent dans les cas les plus sévères.

1.3. Classification

Afin de mieux comprendre cette pathologie et mieux prendre en charge les patients en fonction des causes de la maladie, une classification de l'hypertension pulmonaire a été proposée au *5th World Symposium on Pulmonary Hypertension, à Nice (France) en Octobre 2013* et reprend les cinq groupes déjà reconnus depuis le Symposium d'Evian en 1998 (McLaughlin et al., 2015; Seferian et al., 2014). Cette classification distingue les types d'hypertension pulmonaire en cinq groupes différents au sein desquels sont regroupées différentes pathologies partageant des similitudes anatomo-pathologies et thérapeutiques (Tableau 1). Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au groupe 1 de la classification correspond à l'HTAP proprement dite qui englobe divers types de causes comprenant :

- L'HTAP idiopathique ou HTAP sporadique définie par la survenue de la maladie en l'absence de facteurs de risque connus ou associés ;
- L'HTAP héréditaire définie par la transmission de la maladie par descendance et/ou présence chez un patient d'une mutation d'un des gènes connus pour prédisposer au développement de l'HTAP tels que ALK1 (Harrison et al., 2003) et BMPR2 (Cogan et al., 2006) ;
- L'HTAP associée à la consommation de toxines dont la prise d'anorexigènes (aminorex, amphétamines) ou de drogue (cocaïne) (Montani et al., 2013) ;
- L'HTAP associée à des conditions cliniques comme les connectivites, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ;

- L'hypertension portale associée à une dysfonction au niveau des veines et des capillaires, qui représente 5 % des cas d'HTAP.

Ces situations sont caractérisées par une atteinte des petites artères pulmonaires d'un diamètre inférieur à 500 μm . Les lésions histologiques typiques sont caractérisées par une hypertrophie de la média, un épaissement de l'adventice, une prolifération de l'intima, des infiltrats inflammatoires périvasculaires qui vont déterminer l'apparition d'un remodelage artériel pulmonaire avec des lésions plexiformes et de la thrombose *in situ* (Archer et al., 2000; Tuder et al., 1994).

1.4. Epidémiologie de l'HTAP

L'HTAP est une maladie rare dont l'incidence et la prévalence précise sont difficiles à évaluer du fait de l'absence de spécificité des symptômes. La maladie est souvent diagnostiquée plusieurs mois après le début des symptômes (2 ans en moyenne), aboutissant à des diagnostics tardifs à un stade avancé, moins accessible aux thérapeutiques actuelles (Humbert et al., 2006). Il est ainsi possible que certains cas d'HTAP ne soient pas diagnostiqués du fait des obstacles pratiques à l'affirmation du diagnostic par cathétérisme cardiaque droit. Néanmoins, les progrès récents de l'échocardiographie avec Doppler pulsé ont grandement facilité le dépistage de la maladie.

Selon le registre national français ouvert en 2002, l'incidence annuelle d'HTAP est estimée entre 2 et 5 cas par million d'habitants adultes, ce qui correspond à une prévalence estimée entre 15 et 25 cas par million d'habitants adultes pour les HTAP associées à diverses pathologies, et de 6 cas par million d'habitants pour la forme idiopathique (Humbert et al., 2006). Cette prévalence a été établie sur une étude multicentrique regroupant 674 cas d'hypertension pulmonaire (Chin et al., 2008; McGoon et al., 2013). Cette maladie a une prédominance féminine, elle touche 2 à 4 fois plus de femmes que d'hommes avec un pic de fréquence qui se situe entre 30 et 50 ans en moyenne pour les HTAP idiopathiques (Humbert et al., 2006), mais il existe des variations importantes en fonction des pathologies associées (Vonk-Noordegraaf et al., 2014).

L'HTAP survient le plus souvent sporadiquement, mais il existe des cas familiaux (Sztrymf et al., 2007). Ces formes sont souvent rapportées à des mutations germinales de gènes codant pour des protéines de la superfamille du transforming growth factor β (TGF β) regroupant le Bone Morphogenetic Protein Receptor type 2 (BMP2) (Newman et al., 2001),

l'Activin receptor like kinase 1 (ALK1) et l'endogline (ENG). Ces mutations sont retrouvées dans environ 80 % des formes familiales, mais aussi dans environ 15 % des formes idiopathiques pour lesquelles d'autres cas familiaux n'ont pas été diagnostiqués (Sztrymf et al., 2008). La fréquence des cas associés à d'autres conditions dépasse celle des cas idiopathiques et est dépendante de l'épidémiologie (Simonneau et al., 2009).

Tableau 1 : Classification des hypertensions pulmonaires (HTAP) définie lors du 5th World Symposium on pulmonary hypertension (WSPH) en Octobre 2013, à Nice, France (Simonneau et al., 2014)

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)
1.1 Idiopathique
1.2 Héritable
1.2.1 BMPR2
1.2.2 ALK1, ENG, SMAD-9, CAV1, KCNK3
1.2.3 Inconnue
1.3 Induite par une drogue ou une toxine
1.4 Associée à :
1.4.1 des maladies du tissu conjonctif
1.4.2 une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)
1.4.3 une hypertension portale
1.4.4 une cardiopathie congénitale
1.4.5 une schistosomiase
1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire
1''. Hypertension pulmonaire persistance du nouveau-né
2. Hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche
2.1 Dysfonction systolique du ventricule gauche
2.2 Dysfonction diastolique du ventricule gauche
2.3 Maladie valvulaire
2.4 Obstruction congénitale ou acquise au niveau du tract d'éjection ou de remplissage du ventricule gauche et cardiomyopathie congénitale
3. Hypertension pulmonaire associée à des maladies pulmonaires et/ou une hypoxémie
3.1 Broncho-pneumopathie chronique obstructive
3.2 Maladie pulmonaire interstitielle (MPI)
3.3 Autres maladies pulmonaires avec pattern restrictif et obstructif mixte
3.4 Troubles respiratoires du sommeil
3.5 Hypoventilation alvéolaire
3.6 Exposition chronique aux hautes altitudes
3.7 Anomalies du développement
4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique
5. Hypertension pulmonaire ayant des mécanismes multifactoriels incertains
5.1 Troubles hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndrome myéloprolifératif, splénectomie
5.2 Troubles systémiques : Sarcoidose, histiocytose à cellules de Langerhans pulmonaire, lymphangioléiomyomatose
5.3 Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdie
5.4 Divers : obstruction tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique, hypertension pulmonaire

BMPR2: bone morphogenetic protein receptor type 2; CAV1: caveolin-1; ENG: endogline.

1.5. La circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire forme un réseau vasculaire à basse pression, basse résistance et haute distensibilité. La circulation pulmonaire issue du cœur droit permet les échanges respiratoires dans les poumons. Ces échanges gazeux sont facilités par la vaste surface d'échange alvéolo-capillaire. En effet, le sang veineux quitte le cœur droit par le tronc pulmonaire qui se divise en artère pulmonaire droite et gauche puis successivement pour donner les artérioles pulmonaires donnant naissance aux capillaires pulmonaires autour des alvéoles pulmonaires dans lesquels le dioxyde de carbone passe avant d'être expiré (Figure 1). Le réseau de capillaires pulmonaires tapisse la paroi des alvéoles et assure les échanges gazeux au travers de la barrière alvéolo-capillaire permettant la réoxygénation du sang. Le sang riche en oxygène (O₂) est d'abord collecté dans les petites veines pulmonaires qui rejoignent ensuite les veines pulmonaires et le cœur gauche correspondant à la circulation systémique (Figure 1).

Les artères pulmonaires reçoivent directement la fraction d'éjection sanguine venue du VD. Ainsi, selon la loi de Poiseuille (Prothero et al., 1962; Roos et al., 1962), la PAPm est influencée par le débit sanguin pulmonaire (Q), le diamètre des vaisseaux (r), la longueur des vaisseaux (L), la viscosité du sang (η) et l'ensemble des résistances vasculaires pulmonaires (R) qui s'opposent au flux sanguin, avec :

$$\text{PAPm} = Q \times R \text{ avec } R = 8 \cdot \eta \cdot L / \pi \cdot r^4$$

Equation 2. Loi de Poiseuille

Où R est la résistance vasculaire pulmonaire ($Pa \cdot s \cdot m^{-3}$), η est le coefficient de viscosité du sang ($Pa \cdot s$), L est la longueur du vaisseau (m), r est le diamètre du vaisseau (m^4).

Toute modification importante du débit cardiaque, de la surface du lit vasculaire pulmonaire ou des pressions post-capillaires (cardiopathie gauche) perturbe donc l'équilibre hémodynamique de ce système. En cas d'augmentation du flux sanguin, ce système peut recruter un grand nombre de vaisseaux normalement non perfusés. La pression transmurale des artères pulmonaires reste toujours basse expliquant la finesse de la paroi de ces artères (Perros et al., 2007). Ainsi, une augmentation de la résistance vasculaire diminue la perfusion sanguine pulmonaire et les échanges gazeux. La circulation pulmonaire s'adapte aux variations de débit (Dao et al., 2006).

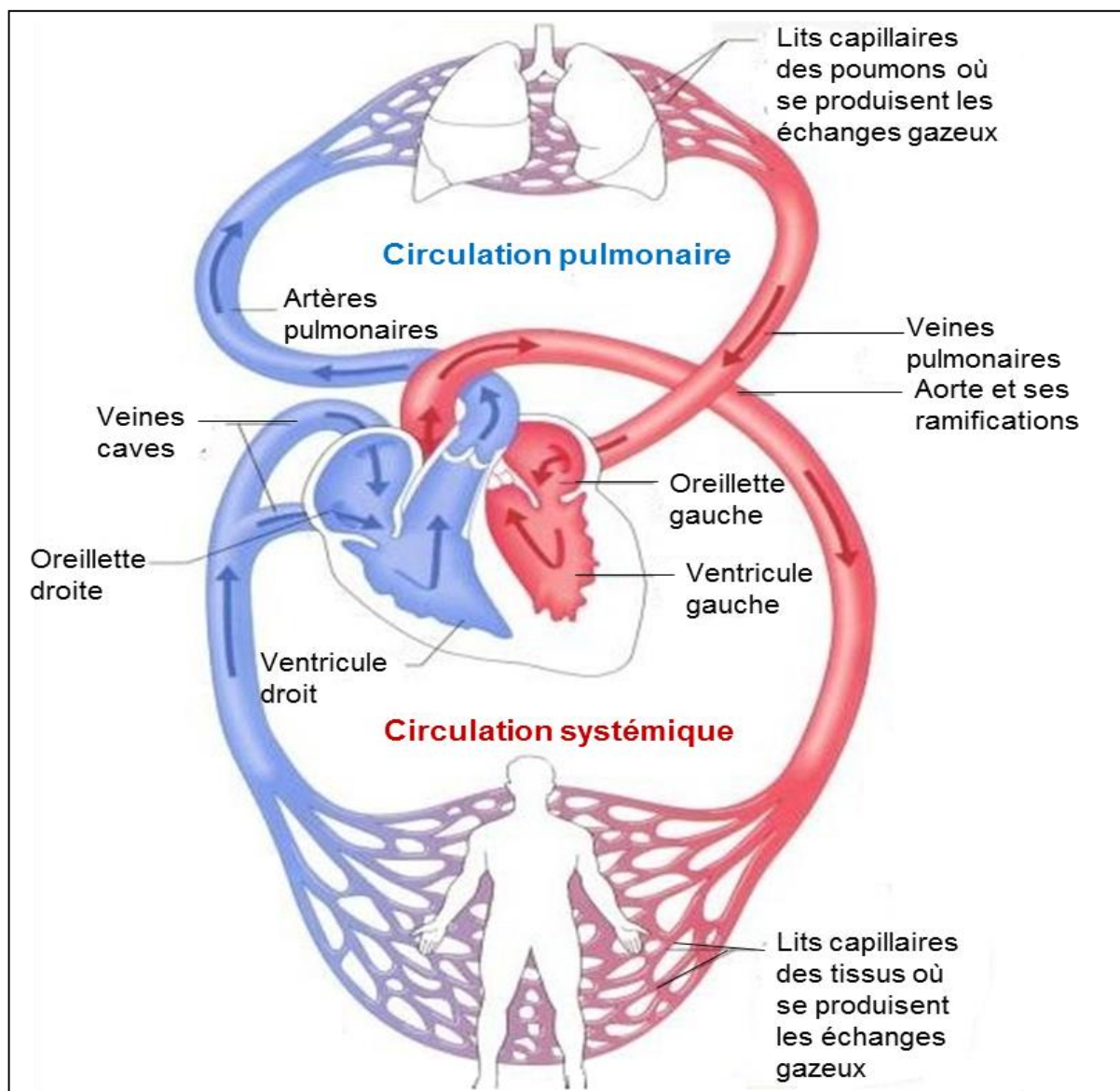


Figure 1: Circulation pulmonaire et circulation systémique
 (Source : <http://www.alloprof.qc.ca/BV/pages/s1274.aspx>)

Le lit vasculaire comporte différents types de vaisseaux, on distingue : les artères élastiques (gros calibre) jusqu'au réseau sous-segmentaire, qui par leur propriété élastique vont se dilater lors de l'HTAP, les artères distales (jusqu'aux bronchioles terminales), les capillaires, les veinules et les veines pulmonaires. Les artères pulmonaires telles qu'il en est question dans ce manuscrit sont les artères distales qui sont majoritairement affectées dans l'HTAP.

La paroi artérielle est constituée de 3 couches individualisées de la lumière à la périphérie (Figure 2) : l'intima, la média et l'adventice (Mulvany et al., 1990)

- **L'intima** : c'est la couche la plus interne des vaisseaux. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) et d'une membrane basale (collagène de type IV, laminine, glycoprotéines). L'intima joue un rôle majeur d'interface entre le sang et la paroi artérielle. Les CE ont une fonction fibrinolytique, antithrombotique, elles permettent la modulation de la vasomotricité artérielle par la synthèse et la transmission de nombreuses substances vasoactives vers le muscle lisse sous-jacent. À la différence des veines qui sont flasques, les artères ne disposent pas de valves.

- **La média** : c'est la couche intermédiaire et la plus épaisse de la paroi artérielle. Elle est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses (CML), de fibres élastiques et de fibres de collagène. La média des artères pulmonaires musculaires est plus fine que celle des artères systémiques et comporte une limitante élastique interne, elle ne possède pas de limitante externe contrairement aux artères systémiques qui comportent deux limitantes élastiques (interne et externe).

- **L'adventice** : c'est la couche périphérique, elle est constituée de fibroblastes et de fibres de collagène, macrophages, terminaisons nerveuses et de vasa vasorum.

Il existe également de nombreuses interactions entre les différentes couches, plus particulièrement entre les CML et les CE, mais également avec les éléments du plasma et figurés du sang (plaquettes, globules rouges et blancs).

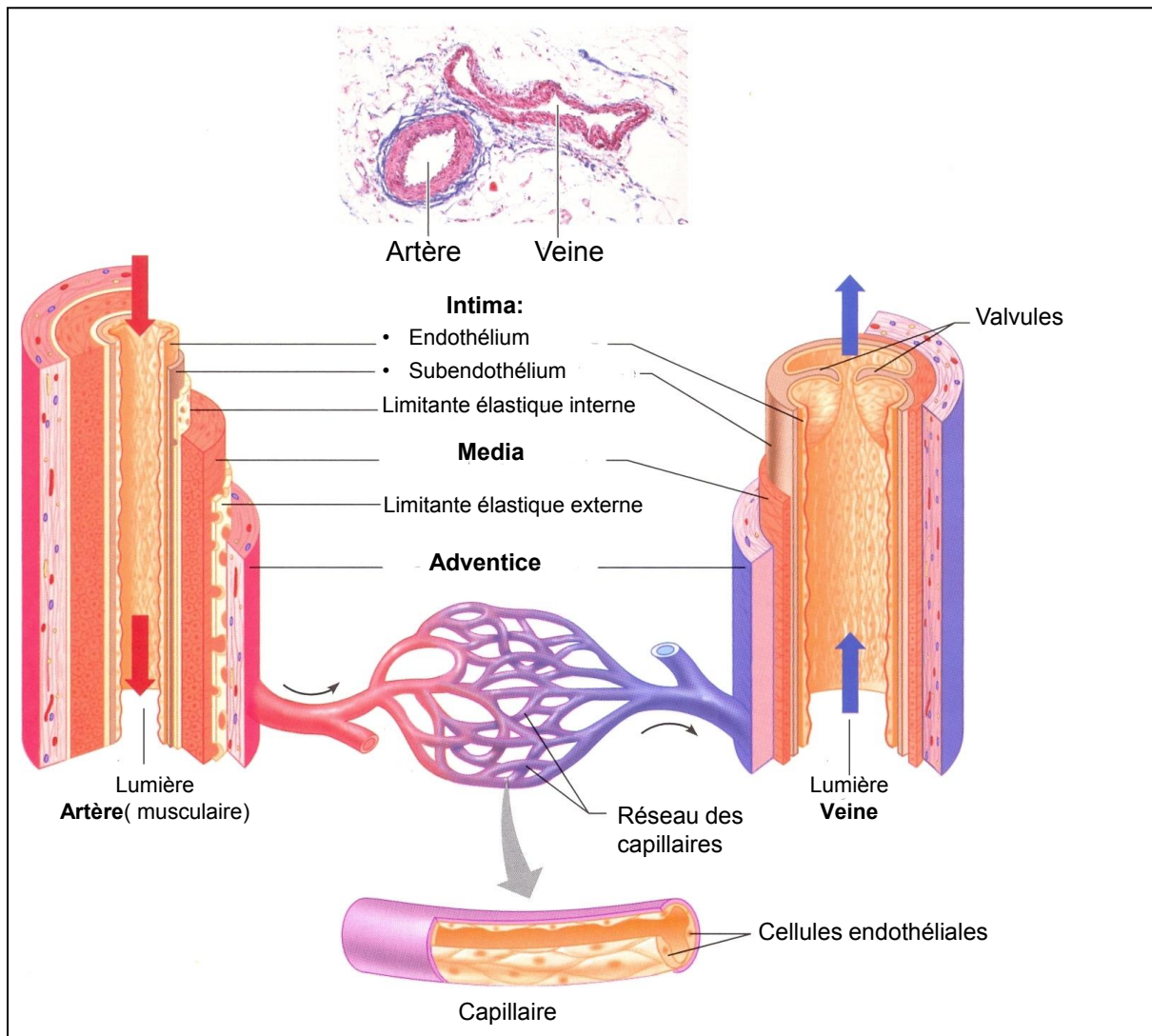


Figure 2: Structure d'artère et de veine pulmonaire.
(Schéma réalisé par Jérôme Harlé, 2009)

2. Anato-pathologie de l'HTAP

L'HTAP est caractérisée par une altération structurelle et fonctionnelle des vaisseaux de la circulation pulmonaire prédominant dans les artères pulmonaires distales et les artérioles. Cette altération est associée à une vasoconstriction conduisant à un remodelage des artérioles pulmonaires et à une obstruction artérielle (Morrell et al., 2009). Ces modifications sont donc à l'origine d'une élévation persistante des RVP et d'une diminution du flux sanguin pulmonaire.

Le remodelage vasculaire pulmonaire est associé à une prolifération anormale des CE et des CML pulmonaires conduisant à une hypertrophie de la média, une fibrose intimale, des lésions plexiformes et des thromboses *in situ* (Humbert et al., 2002).

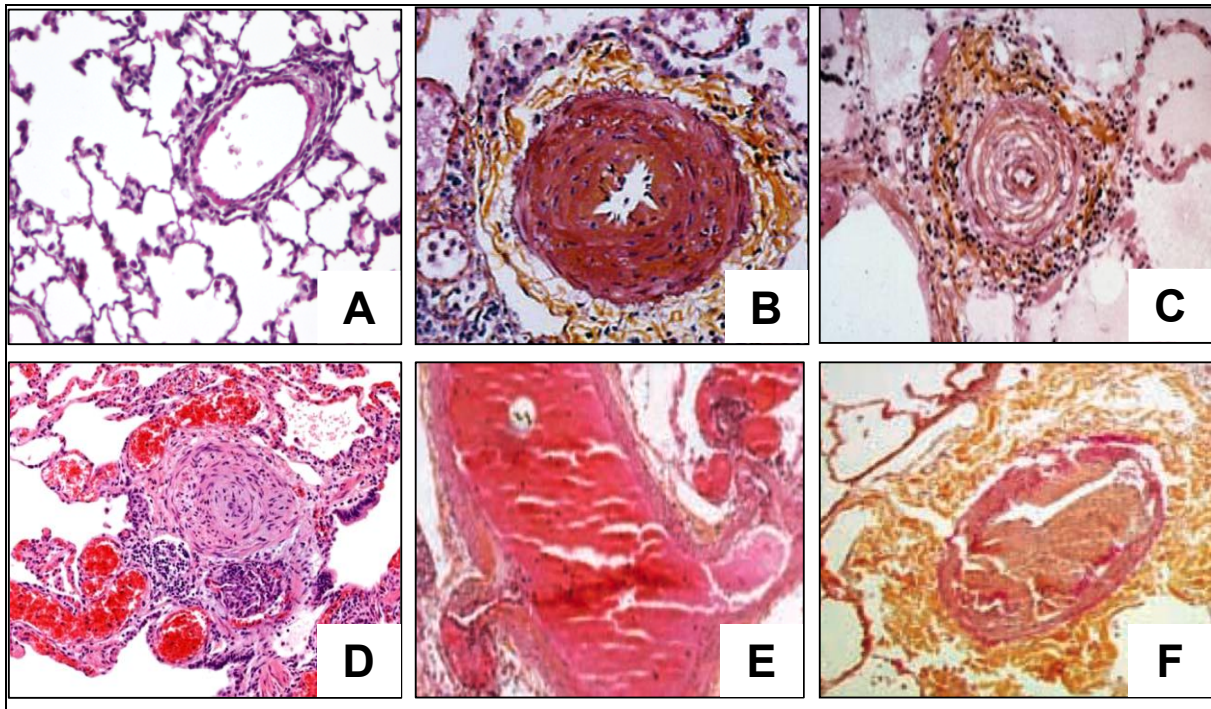


Figure 3: Remodelages de la paroi artérielle conduisant à l'HTAP. (A) Artère normale, (B) Hypertrophie médiale et épaissement adventicielle, (C) Fibrose intimale, (D) Lésion plexiforme, (E) Dilatation et lésion plexiforme, (F) Thrombose (Meyrick et al., 2001).

- **L'hypertrophie médiale** est la première des modifications pathologiques observables dans l'HTAP, elle est caractérisée par la prolifération des CML et par une augmentation de la matrice conjonctive et des fibres élastiques. L'épaississement de la media des petites artères pulmonaires lors d'une hypertension pulmonaire contribue à l'augmentation de la résistance créée par la vasoconstriction et diminue la capacité des vaisseaux à se dilater passivement.

- **La fibrose intimale** concentrique, dite lésion en bulbe d'oignon, résulte de la prolifération des CE et de fibroses sous-endothéliales. On retrouve la formation de néo-intima, une couche supplémentaire constituée de myofibroblastes et d'une infiltration importante des lymphocytes et des macrophages entre l'endothélium et la limitante élastique interne. Le néo-intima favorise l'occlusion des vaisseaux et contribue à la formation des lésions plexiformes ou fibrose intimale concentrique.

- **La lésion plexiforme** est un réseau complexe de canaux vasculaires dans lesquels on trouve des segments artériels anévrysmaux. Elle est marquée par une prolifération focale des CE entourées de myofibroblastes, des CML et de matrice extracellulaire.

- **La lésion thrombotique** est caractérisée par une fibrose et une fragilisation conduisant aux dilatations, et par une thrombose locale provoquant des obstructions artérielles avec des phénomènes de recanalisation.

Ces lésions vasculaires pulmonaires sont aggravées par des infiltrats inflammatoires périvasculaires et du stress oxydant vasculaire. Des lésions veinulaires et capillaires peuvent s'associer à ces atteintes, voire même prédominer dans certains contextes spécifiques (Jeffery et al., 2002). Des données expérimentales suggèrent qu'il existe une surexpression des métalloprotéinases matricielles (MMP), essentiellement les MMP-2 et MMP-9, et que ces protéases sont impliquées dans la migration des fibroblastes adventitiels et la formation du néo-intima (Humbert et al., 2004; Li et al., 2016).

En résumé, le remodelage de la média et de l'intima marqué par l'épaississement de la paroi dû à l'hyperplasie, l'hypertrophie, la muscularisation chronique et l'obstruction de la lumière des vaisseaux est un phénomène irréversible qui a pour conséquence d'augmenter la pression artérielle pulmonaire et d'aggraver l'HTAP (Sakao et al., 2011).

3. Physiopathologie de l'HTAP

L'HTAP est caractérisée par un remodelage obstructif et progressif du lit vasculaire pulmonaire. Il est aujourd'hui bien établi que la dysfonction endothéliale constitue un élément majeur de la pathogénèse de l'HTAP. La dysfonction endothéliale résulte d'un défaut de production de substances vasodilatatrices et antiprolifératives (le monoxyde d'azote et la prostacycline) et à une production excessive de substances vasoconstrictrices et mitogènes (l'endothéline-1, le thromboxane A₂), stimulant également la prolifération vasculaire pulmonaire et la thrombose artérielle. L'ensemble de ces anomalies provoquent un remodelage vasculaire pulmonaire, exacerbé par l'inflammation et le stress oxydant (Figure 4).

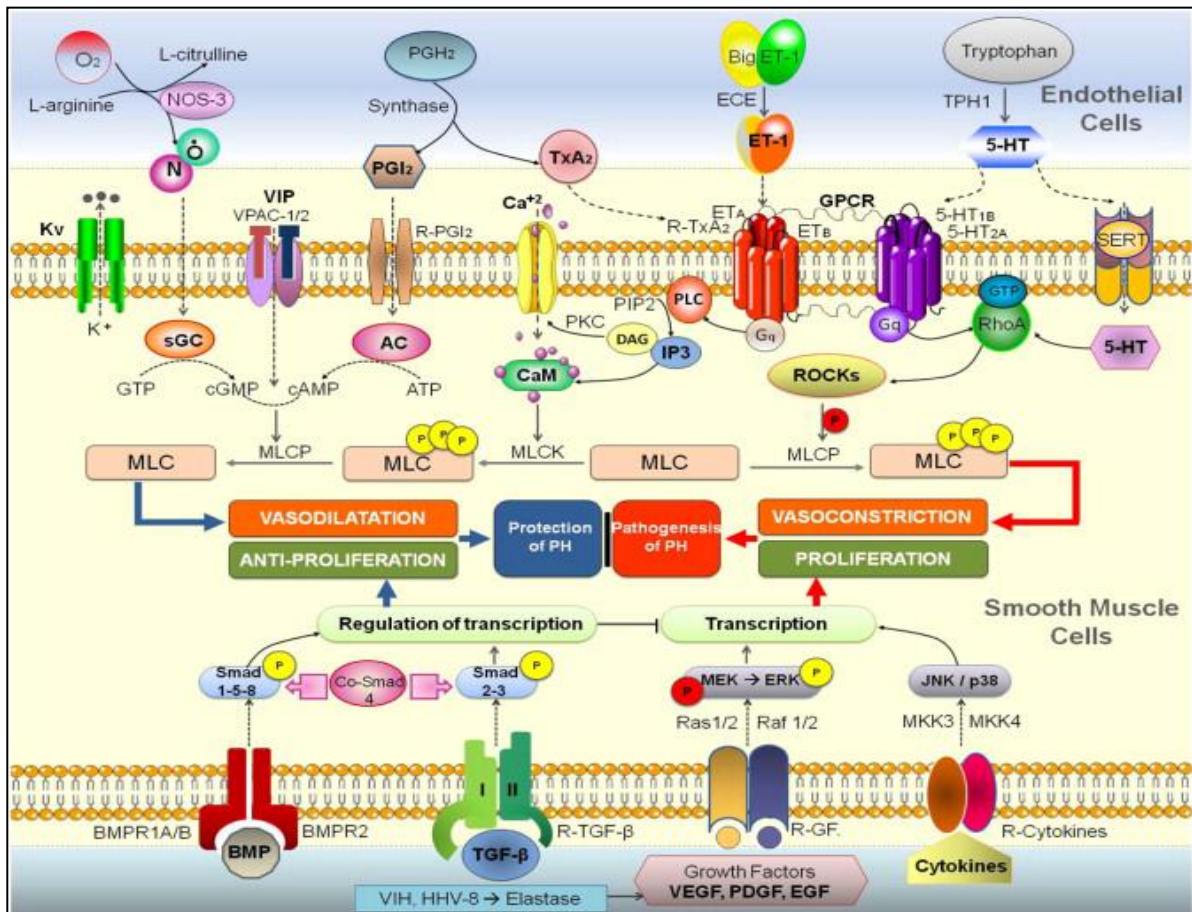


Figure 4: Voies de signalisations impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP. En haut : dans la cellule musculaire lisse, la vasodilatation est effectuée par le NO, la PGI₂ et le VIP *via* le GMPC et l'AMPC. La vasoconstriction est régulée par l'ET-1, TxA₂, 5-HT couplés aux protéines G et l'IP₃, et la voie RhoA/Rhokinase. En bas : la prolifération de la cellule musculaire lisse est sous le contrôle des cytokines, des facteurs de croissances et du TGF-β. La transcription est effectuée par les protéines BMP, ses récepteurs membranaires, et les voies de signalisation des Smad et des MAP kinases (MKK et ERK) (Duong-Quy et al., 2013).

3.1. Dysfonction endothéliale pulmonaire dans l'HTAP

Les cellules endothéliales (CE) régulent les fonctions vasculaires pulmonaires. En effet, les CE synthétisent et sécrètent des facteurs vasoconstricteurs (TXA₂, ET-1, 5-HT) et vasodilatateurs (NO et PGI₂) modulant le tonus vasculaire, la réponse inflammatoire, la perméabilité endothéliale, l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocyte, la prolifération des CML ainsi que la régulation de la fibrinolyse (Chan et al., 2008; Davignon et al., 2004). Les CE sécrètent de plus des médiateurs anti-thrombotiques et anticoagulants. Elles sont sensibles aux signaux pro- et anti-inflammatoires. Dans l'HTAP, l'endothélium subit des modifications importantes qui participent directement à l'aggravation de la sévérité de la maladie (Budhiraja et al., 2004).

La dysfonction endothéliale résulte à une diminution des facteurs vasodilatateurs et antiprolifératifs (NO et PGI₂) et à une surproduction des facteurs vasoconstricteurs et pro-mitogènes (TXA₂, ET-1 et 5-HT) et des facteurs de croissance comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Morrell et al., 2009). Ces médiateurs ont des effets directs sur les CMLV pulmonaires en stimulant la contraction, la migration et la prolifération cellulaires. Ils possèdent aussi la capacité d'altérer le remodelage vasculaire par interaction avec des fibroblastes et des facteurs de coagulation et/ou d'inflammation (Duong-Quy et al., 2012). La dysfonction endothéliale vasculaire pulmonaire se caractérise sur le plan pharmacologique par l'absence de réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine (Furchgott and Zawadzki, 1980; Pepke-Zaba et al., 1991).

3.1.1. Le monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un puissant vasodilatateur, possédant des effets anti-inflammatoires, antiprolifératifs et antiagrégants (Loscalzo et al., 2001). Le NO joue un rôle fondamental dans la régulation du tonus vasculaire. Le NO est synthétisé de manière endogène par la NO synthase endothéliale (eNOS) à partir de la L-arginine en présence de ses cofacteurs (NADPH, BH₄) (Moncada et al., 1993). Une fois le NO produit, il diffuse de la cellule endothéliale vers les CML pulmonaires où il active la guanylyl cyclase soluble (GCs), entraînant la production de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et l'activation de la protéine kinase G (PKG). Le NO exerce son action vasodilatatrice et antiproliférative par l'action de GMPc. L'activation de ces protéines kinases dépendant du GMPc (PKG) provoque l'ouverture des canaux potassiques avec efflux de potassium (K⁺) hors de la cellule entraînant ainsi l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire (Figure 5). Il y a aussi une diminution de

la concentration de calcium intracellulaire responsable de la relaxation des CML pulmonaires. L'ensemble des mécanismes impliqués converge pour diminuer l'activité des Kinases des chaînes légères de la myosine (MLCK), ce qui diminue le niveau de phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC) et permet la vasodilatation des artères pulmonaires et l'augmentation transitoire du flux sanguin dans le poumon (Figure 5). Cependant, le GMPc est rapidement dégradé par la PDE-5, ce qui permet de mettre fin à son action vasodilatatrice (Michel et al., 2005).

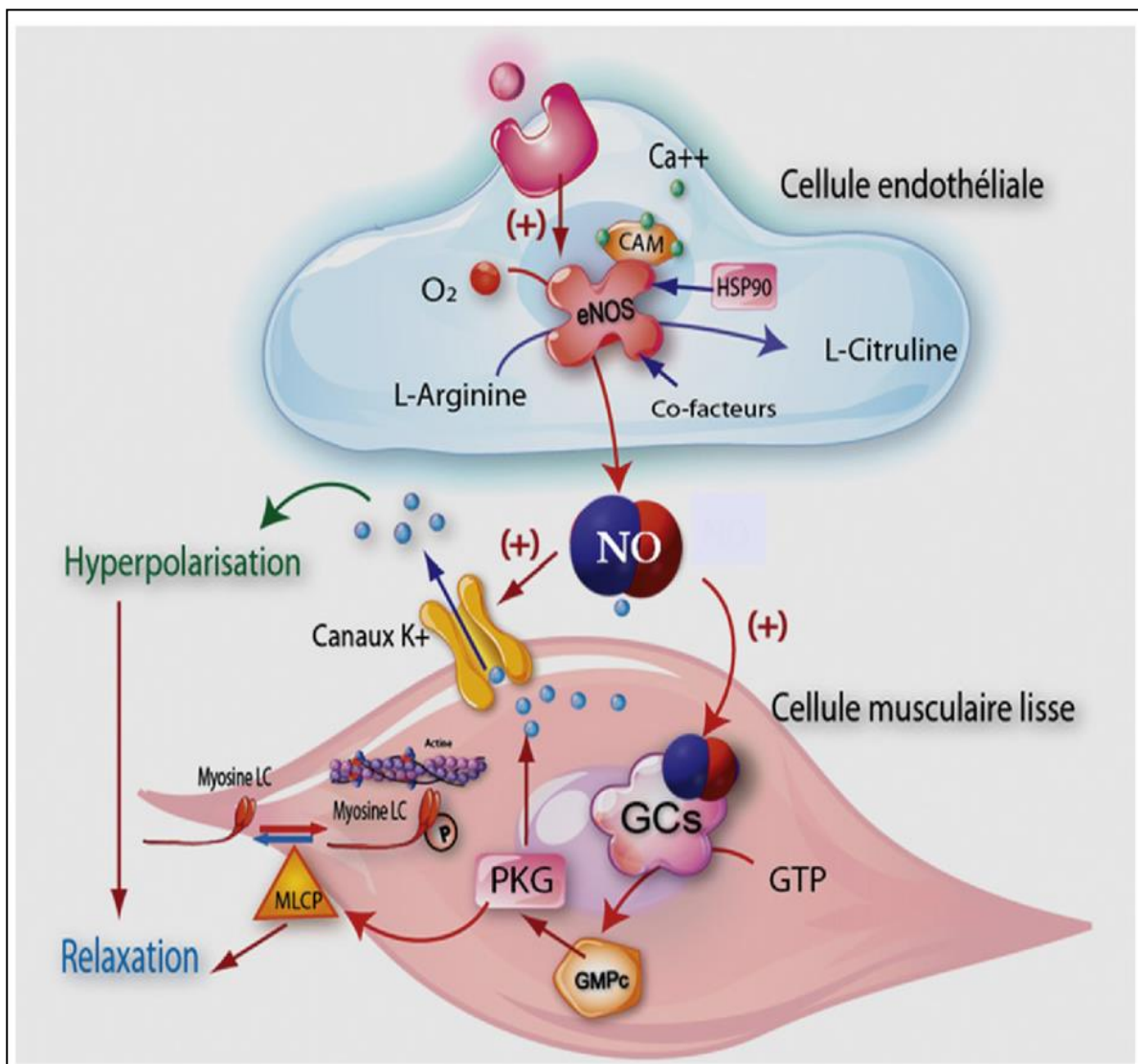


Figure 5: Rôle du monoxyde d'azote dans la vasodilatation de l'artère pulmonaire. Abréviations: Ca^{++} : calcium ; CaM : calmoduline ; eNOS : NO synthase endothéliale ; NO : monoxyde d'azote ; K^{+} : potassium ; GCs : guanylyl cyclase soluble ; GTP : guanosine triphosphate ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; PKG : protéines kinases dépendante du GMPc ; P : phosphate ; MLCP : phosphatase des chaînes légères de la myosine (Duong-Quy et al., 2012).

Chez un sujet sain, les vaisseaux pulmonaires se dilatent, permettant une augmentation du débit sanguin pendant l'exercice, sans élévation des PAP. Il a été démontré que le NO était impliqué dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire, et qu'il inhibe la prolifération des CML et l'agrégation plaquettaire de base et permet de s'opposer aussi à la vasoconstriction induite par hypoxie (Pepke-Zaba et al., 1991).

Les patients atteints d'HTAP souffrent d'une diminution de l'expression de la eNOS, se basant sur l'hypothèse que la diminution de la synthèse de NO contribue à l'augmentation des RVP (Giaid et al., 1995). La diminution de la biodisponibilité du NO participe au défaut de vasodilatation liée à la dysfonction endothéliale des sujets HTAP (Houtchens et al., 2011; Kaneko et al., 1998). Ceci suggère que la vasoconstriction et la prolifération des CML deux phénomènes constants impliqués dans le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP, sont dus à une diminution de l'activation de la NOS endothéliale. De plus, il a été démontré que l'augmentation de l'apport exogène de NO permettait de diminuer la pression systolique du VD et de son hypertrophie dans l'HTAP induite par l'hypoxie chronique chez le rat (Ozaki et al., 2001).

3.1.2. La prostacycline et le thromboxane A₂

La prostacycline (PGI₂) et le thromboxane A₂ (TXA₂) sont des métabolites de l'AA produits par l'endothélium vasculaire par la voie de cyclooxygénase-1 (Gordon et al., 1983; Gryglewski et al., 1976). Ils sont libérés en réponse aux forces de cisaillement (Macintyre et al., 1978) (Figure 6).

La PIG₂ est un puissant vasodilatateur pulmonaire endogène et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de la prolifération cellulaire qui agit par le biais de l'activation des voies dépendantes de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). En effet, la PIG₂ peut diffuser de la CE vers la CML où elle se lie à son récepteur spécifique, le récepteur IP1 situé à la membrane des CML. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Elle active l'AC qui en présence d'ATP, produit de l'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA). La PKA active les voies de signalisation qui favorisent la diminution de l'activation de la MLCK et de la phosphorylation de la MLC, ce qui permet la vasodilatation des artères pulmonaires (Figure 6) (Hathaway et al., 1985).

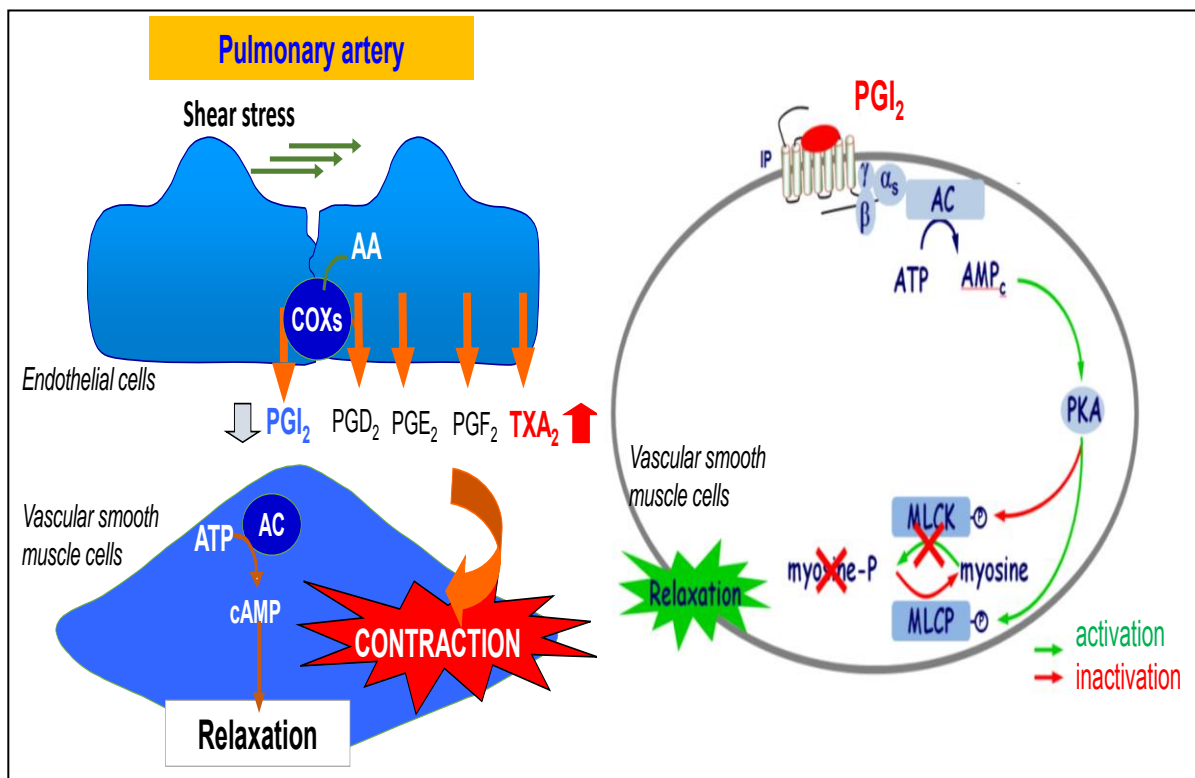


Figure 6 : Synthèse des prostaglandines (PG) et thromboxane A₂ (TXA₂) à partir de l'acide arachidonique (AA) par l'action de la cyclooxygénase-1. La PGI₂ agit sur son récepteur IP et permet l'augmentation d'AMPc grâce à l'activation de l'adénylyl cyclase. L'AMPc va activer la PKA qui va phosphoryler la MLCK et la MLCP. La myosine n'étant plus phosphorylée, elle ne peut plus se lier à l'actine ce qui conduit à une relaxation des CMLV. Abréviations : IP : récepteur de la PGI₂ ; AC : adénylyl cyclase ; ATP : adénosine triphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase A ; MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine ; MLCP : phosphatase des chaînes légères de la myosine ; P : phosphorylation (*Schéma reproduit par Said Amissi*).

Il a été démontré que la synthèse de la PGI₂ est diminuée dans les CE pulmonaires des patients HTAP, du fait de la diminution de l'expression de la prostacycline synthase dans ces cellules (Budhiraja et al., 2004; Tuder et al., 1999). Une altération des fonctions des CE dans l'HTAP provoquerait un déséquilibre dans le métabolisme de l'AA avec une diminution de la synthèse en PGI₂, une activation plaquettaire et une augmentation de la synthèse en TXA₂ (Christman et al., 1992). Cette diminution de la disponibilité locale en PGI₂ pourrait favoriser la croissance cellulaire et le remodelage vasculaire (Voelkel et al., 1995).

Le TXA₂ produit par les CE, est un puissant vasoconstricteur et un agrégant plaquettaire. Le TXA₂ se lie spécifiquement aux récepteurs TP présents à la surface des CE et surtout des CML. Les récepteurs TP appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Au niveau des CML, ils provoquent la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique *via* les récepteurs à l'IP₃ et l'ouverture des canaux calciques, ce qui

permet l'entrée du calcium dans la cellule. La concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre est ainsi augmentée. D'autre part, l'activation des récepteurs TP active la voie PKC/CPI-17 et la voie RhoA-GTP/ROCK (Figure 4). L'ensemble de ces phénomènes contribue au maintien du niveau de phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC), ce qui permet de maintenir le tonus et la vasoconstriction (Aburima et al., 2013; Smith et al., 1981). Il a été démontré dans l'HTAP, que le TXA_2 est associé à l'aggravation de la vasoconstriction et de l'agrégation plaquettaire (Cave et al., 1993). De plus, l'expression des récepteurs du TXA_2 est significativement élevée chez les patients atteints d'HTAP (Duong-Quy et al., 2012).

3.1.3. L'endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) est un vaso peptide synthétisé par les CE ayant un effet vasoconstricteur sur les CML, possédant également des fonctions hypertrophiques et mitogènes favorisant la prolifération et la migration cellulaire. Il aggrave l'inflammation vasculaire pulmonaire et la fibrose pulmonaire (Channick et al., 2004). L'action mitogénique de l'ET-1 sur les CMLV pulmonaires se fait par l'intermédiaire de deux récepteurs ET_A et ET_B couplés aux protéines G contribuant à la vasoconstriction et au remodelage des artères pulmonaires dans l'HTAP (Jasmin et al., 2001) (Figure 7). L'ET-1 présente une très forte affinité pour le récepteur ET_A présent uniquement sur les CMLV et une affinité moindre pour le récepteur ET_B présent sur les CE mais aussi sur les CMLV (Motte et al., 2006). Lorsqu'elle se lie aux récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CMLV, elle active la phospholipase C (PLC) qui permet le maintien du niveau de phosphorylation de la MLC et augmente la vasoconstriction, la prolifération et la résistance à l'apoptose (Jeffery et al., 2002; Wynne et al., 2009). Par contre, en stimulant les récepteurs ET_B des CE, l'ET-1 provoque l'augmentation de la sécrétion de NO et de PGI_2 , ce qui contribue à induire la relaxation des CMLV (Figure 7). Dans les conditions physiologiques, il y a une régulation fine entre vasoconstriction et vasorelaxation pour permettre le passage normal du flux sanguin à travers les artères (Agapitov et al., 2002). Par conséquent, l'ET-1 issue de l'endothélium est un acteur essentiel du déséquilibre entre vasodilatation et vasoconstriction caractéristique de l'HTAP (Yildiz et al., 2009).

Il a été démontré que les patients atteints d'HTAP présentent des concentrations anormalement élevées en ET-1 dans le sang. De plus, l'ET-1 est impliqué dans l'augmentation de l'agrégation plaquettaire, la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la réponse inflammatoire (Giaid et al., 1993). Ces observations indiquent que l'ET-1 est

probablement la composante vasoactive de l'HTAP, contribuant au développement et à la sévérité du remodelage pulmonaire dans l'HTAP (Montani et al., 2007).

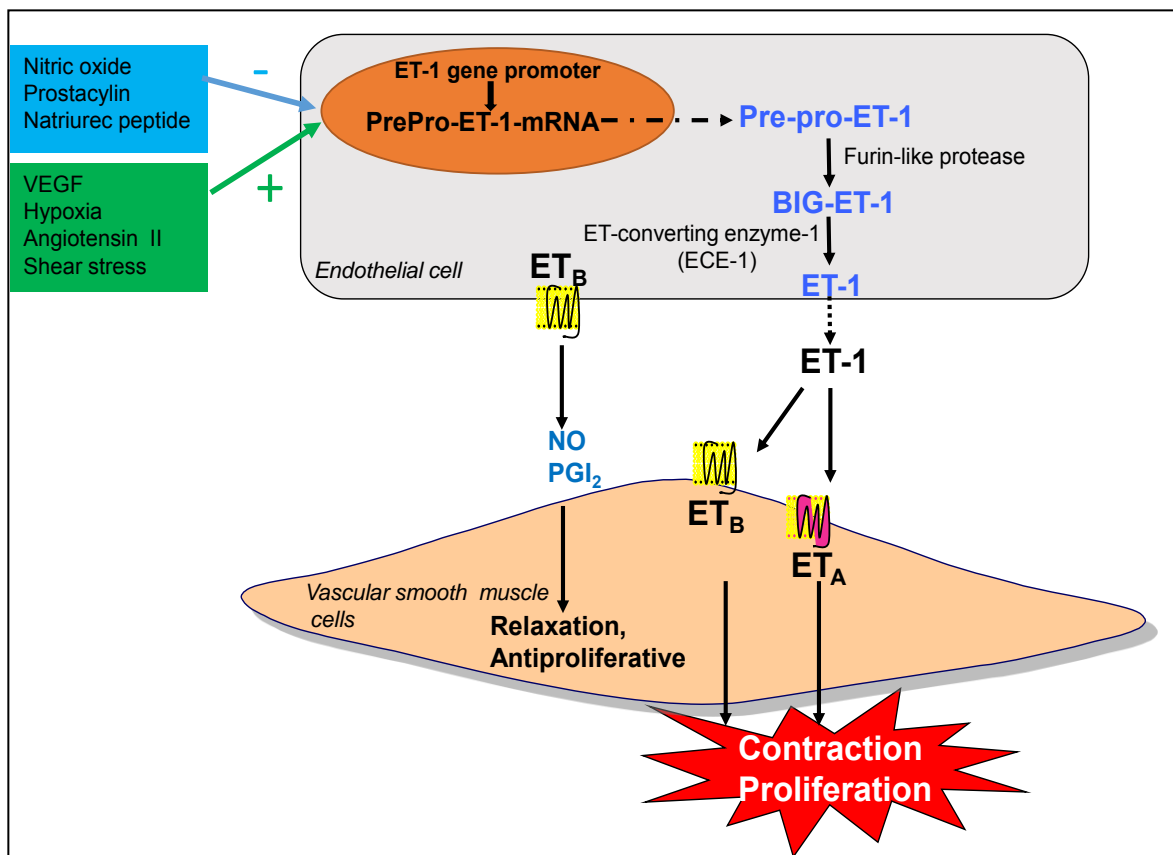


Figure 7: Régulation de la synthèse de l'ET-1 : les voies de production, les récepteurs ainsi que l'effet sur les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (CMLVP). La synthèse d'ET-1 débute avec la transcription de préproET-1 qui est clivé par une endopeptidase pour former le précurseur proET-1 (Big ET-1). Big ET-1 est ensuite transformé en peptide mature par la métalloprotéinase endothélin-converting enzyme-1 (ECE-1). Deux récepteurs d'ET ont été identifiés, ET_A que l'on retrouve sur les CMLV, son activation permet une vasoconstriction et prolifération cellulaire, alors que les récepteurs ET_B se situent sur les cellules endothéliales et les CMLV et conduisent principalement à une vasodilatation (Remuzzi et al., 2002).

Les résultats thérapeutiques obtenus avec l'utilisation chronique des inhibiteurs des récepteurs ET_A/ET_B, tel que le bosentan, ont démontré leur efficacité à diminuer l'action de l'ET-1 et donc à limiter le remodelage pulmonaire, permettant ainsi l'amélioration des paramètres hémodynamiques chez les patients atteints d'HTAP. L'ET-1 et le TXA₂ ont une influence sur l'expression des gènes et des voies de signalisations directement impliquées dans la prolifération et la migration cellulaire tels que le VEGF, les MMP2 et MMP9 (Wang et al., 2006).

3.1.4. La sérotonine

La sérotonine (5-HT) est un neuromédiateur de la famille des indolamines ayant pour précurseur commun le tryptophane. Elle agit par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT_A et 5-HT_B et de son transporteur 5-HTT (MacLean et al., 2000). En se fixant sur son récepteur situé sur la CML vasculaire pulmonaire, elle peut activer une voie de signalisation menant à la vasoconstriction et la prolifération cellulaire. Il a par ailleurs été montré une inhibition de l'apoptose des CML vasculaires pulmonaires par la 5-HT (Liu et al., 2013). Ses taux circulants sont augmentés en cas d'HTAP alors que le taux plaquettaire est diminué. Soulignons que c'est par un dysfonctionnement direct de métabolisme de 5-HT que certains médicaments anorexigènes dont la fenfluramine, ont été à l'origine de cas d'HTAP (Abenham et al., 1996). En effet, la prise d'anorexigènes conduit à une augmentation des taux de 5-HT en provoquant la libération de 5-HT plaquettaire et en diminuant sa recapture (Houtchens et al., 2011).

3.1.5. Les facteurs de croissance

Plusieurs facteurs de croissance ont été impliqués dans la genèse de l'HTAP. La plupart de ces facteurs se lient à des récepteurs possédant une activité tyrosine kinase, à l'exception du TGF- β . On peut citer le vascular endothelial growth factor (VEGF), le platelet derived growth factor (PDGF), le bone morphogenetic protein (BMP) et l'epidermal growth factor (EGF) (Schermuly et al., 2005a; Tuder et al., 2002).

3.1.6. Les canaux ioniques

Il existe plusieurs types de canaux ioniques à la surface des CMLV, qui assurent le passage des ions K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ et contribuent à la modulation des fonctions membranaires et à la stabilité des conditions physiologiques.

Les canaux potassiques se divisent en 6 types : Les BK_{Ca} (Big Potassium Channel), les SK_{Ca} (Small Potassium Channel), les K_v, les K_{ATP}, les K_{IR}, les K_T. L'altération de leur expression ou de leur activité peut causer des anomalies hémodynamiques chroniques (Yuan et al., 1998). Les canaux potassiques dépendants du potentiel (K_v) jouent un rôle important dans la régulation du potentiel transmembranaire. Dans l'HTAP, il a été montré que les K_v peuvent subir des modifications de leur expression et de leur activité (probabilité d'ouverture) à la membrane des CML et participent à la vasoconstriction et au remodelage vasculaire pulmonaire (Figure 8) (Hiram et al., 2016).

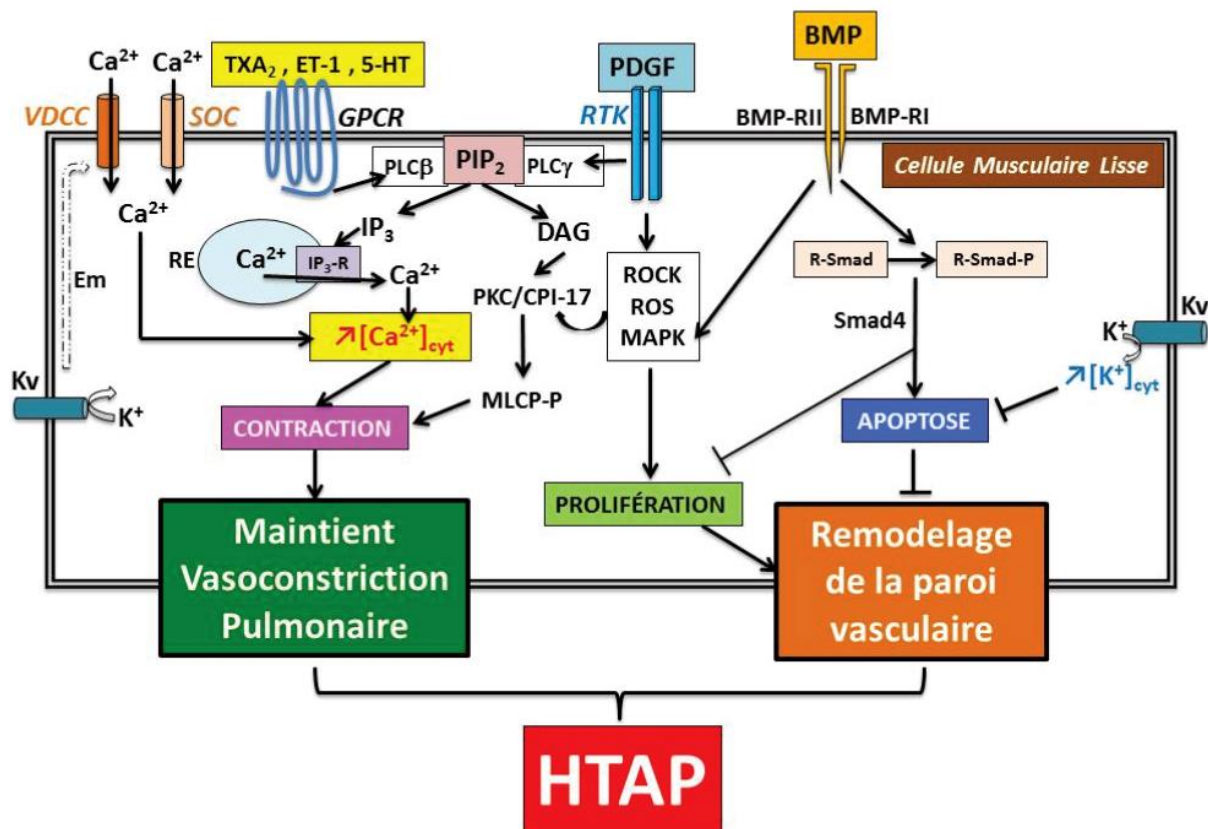


Figure 8 : Dysfonction des CMLV conduisant à l'HTAP. Représentation des principaux canaux, récepteurs et voies de signalisation qui sont anormalement activés et qui contribuent à l'aggravation de l'HTAP (Hiram et al, 2016).

La diminution de l'expression ou le dysfonctionnement des Kv induit une dépolarisation membranaire et une augmentation de l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants. L'influx calcique favorise la contraction des CMLV pulmonaires. Ce phénomène a été mis en évidence chez des patients atteints d'HTAP idiopathique et familiale (Michelakis et al., 1997; Yuan et al., 1998).

Les canaux calciques sont de type L-VDC (Low-Voltage dependent Ca²⁺ channel), ROC (receptor operated channel) et SOC (store operated channel). Ils permettent l'influx de calcium pour assurer la contraction des artères. Les VDC dépendent des variations du potentiel membranaire et constituent les principaux déterminants de l'entrée de calcium. Dans l'HTAP, le phénomène d'hypoxie conduit à la dépolarisation des membranes et modifie l'activité normale des VDC. L'HTAP s'accompagne d'une production anormalement élevée de vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium, qui sont capables d'activer les ROC. L'ensemble permet d'élever la concentration intracellulaire en Ca²⁺ et augmente le niveau de contraction des CML vasculaires pulmonaires (Leblanc et al., 2015) (Figure 8).

3.2. Inflammation et HTAP

De récentes études cliniques et expérimentales mettent en évidence le rôle clé de l'inflammation dans la physiopathologie de l'HTAP (Pullamsetti et al., 2011; Wrigley et al., 2011).

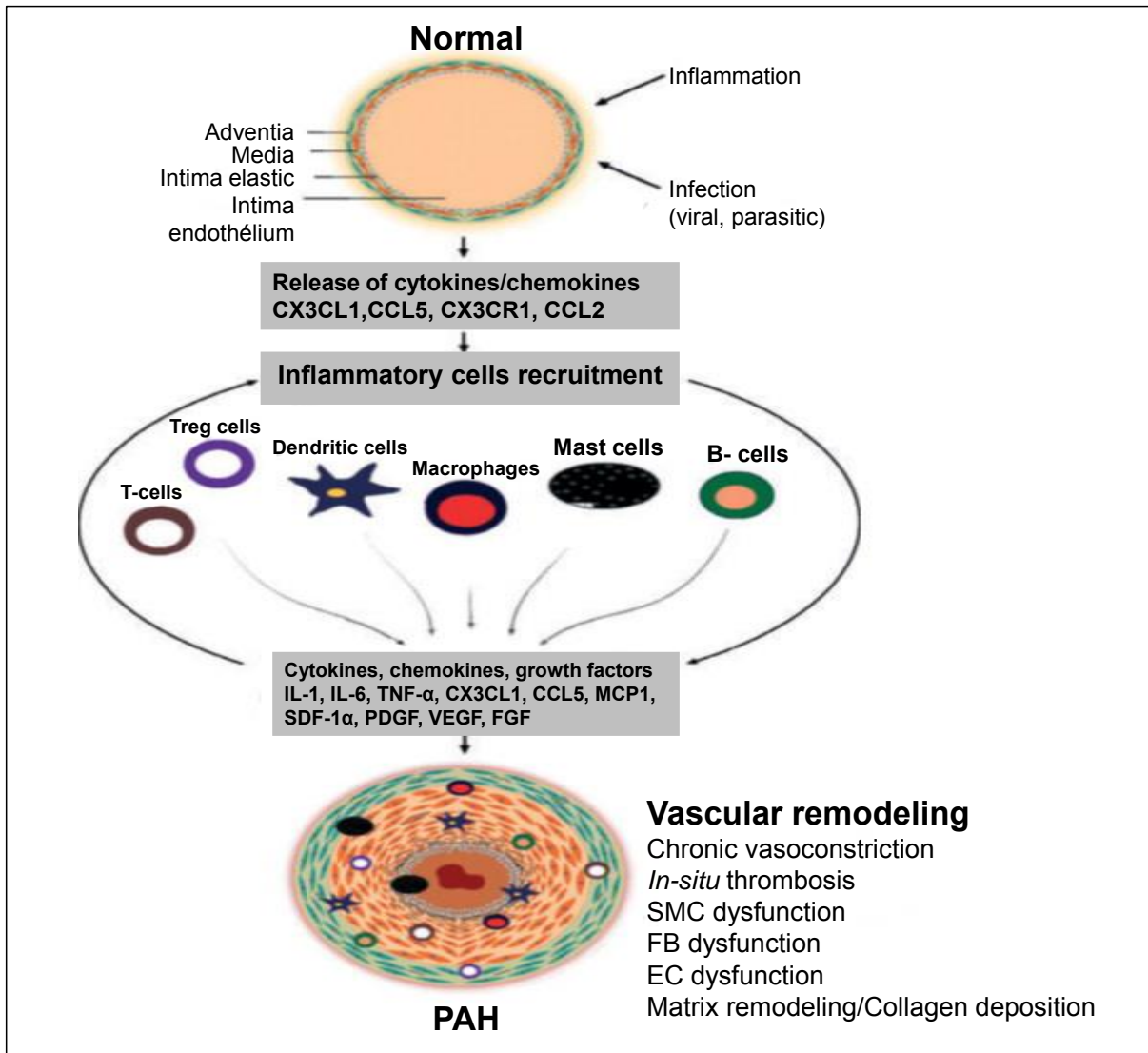


Figure 9 : Principaux facteurs inflammatoires dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Abréviations : IL-1 : interleukine-1 ; IL-6 : interleukine-6 ; CX3CL1 : la fractalkine ; MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1 (Pullamsetti et al., 2011).

Dans l'HTAP, l'adventice est la principale tunique des artères pulmonaires où s'effectue un recrutement accru des cellules immunitaires et pro-inflammatoires. Elle subit un remodelage et s'épaissit significativement par rapport aux conditions normales. L'adventice est composée de fibroblastes et de cellules de l'immunité innée et acquise telles que les lymphocytes B et T,

les cellules *Natural Killer T*, les cellules dendritiques, les cellules cytotoxiques T, les macrophages, les monocytes, les mastocytes et les granulocytes (Dorfmueller et al., 2003).

Ces cellules sécrètent des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance qui se retrouvent dans la circulation sanguine pour répandre leurs effets, au niveau de l'endothélium et des CML des artères pulmonaires (Hassoun et al., 2009). Les patients atteints d'HTAP ont des concentrations sanguines anormalement élevées en cytokines telles que l'IL-1 β (Interleukine-1 β), l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et en chimiokines telles que CCL2 (Chimiokine C-C motif ligand 2), CCL5 aussi appelée RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) et CX3CL1 (Chimiokine C-X3-C motif ligand 1) (Figure 9) (Dorfmueller et al., 2003; Price et al., 2012). Les cytokines et chimiokines stimulent les différents types cellulaires qui composent la paroi des artères pulmonaires et provoquent leur prolifération, migration, hypertrophie et différenciation, ce qui conduit à un ensemble de transformations morphologiques et fonctionnelles responsables du développement, de l'aggravation et de la sévérité de l'HTAP (Hassoun et al., 2009).

Expérimentalement, plusieurs modèles animaux d'HTAP reproduisent les caractéristiques histologiques inflammatoires au niveau des artères pulmonaires (modèles de HTAP induite par l'injection de MCT, ou l'exposition à l'hypoxie chronique) (Huertas et al., 2014). L'analyse histologique des poumons et du cœur droit révèle la présence d'infiltrats inflammatoires (macrophages, lymphocytes B et T, mastocytes et cellules dendritiques) (Watts et al., 2009). Les patients immunodéprimés (infection par le VIH) ou ceux souffrant d'une pathologie inflammatoire chronique ont un risque de développer une HTAP (El Chami et al., 2012). Il semble néanmoins que le développement de nouvelles approches thérapeutiques permettant de moduler la réponse immunitaire innée représente un grand intérêt dans l'HTAP chronique associée à des lésions vasculaires pulmonaires sévères (Rabinovitch et al., 2014).

3.3. Stress oxydant et HTAP

Le remodelage et la prolifération des cellules musculaires décrits dans la pathogénèse de l'HTAP est une réponse à un stress oxydant associé à des réponses inflammatoires. Le stress oxydatif et l'inflammation sont deux processus étroitement liés et qui sont présents dans tous les désordres vasculaires associés à l'HTAP. Ces deux éléments agissent dans un cercle vicieux, puisque le stress oxydatif stimule l'inflammation via la production des cytokines, l'adhésion moléculaire ainsi que l'activation et la prolifération des lymphocytes. Quant à

l'inflammation, elle peut être à l'origine d'un stress oxydatif en favorisant la production des radicaux libres oxygénés (ROS) (Barton et al., 2000 ; Ni et al., 2004).

Le stress oxydant est caractérisé par une augmentation des ROS, pouvant être produites par les tissus pulmonaires de patients souffrant d'HTAP en réponse à une inflammation ou une hypoxie chronique et jouant un rôle important dans l'induction et le développement de l'HTAP (DeMarco et al., 2008). Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité à les neutraliser. Ce déséquilibre altère la relaxation endothélium-dépendante des artères pulmonaires et active l'apoptose et les fonctions mitogènes menant à la prolifération des CML conduisant à l'épaississement de la paroi vasculaire pulmonaire et au développement de l'obstruction vasculaire par la formation de thrombose *in situ* (Tabima et al., 2012).

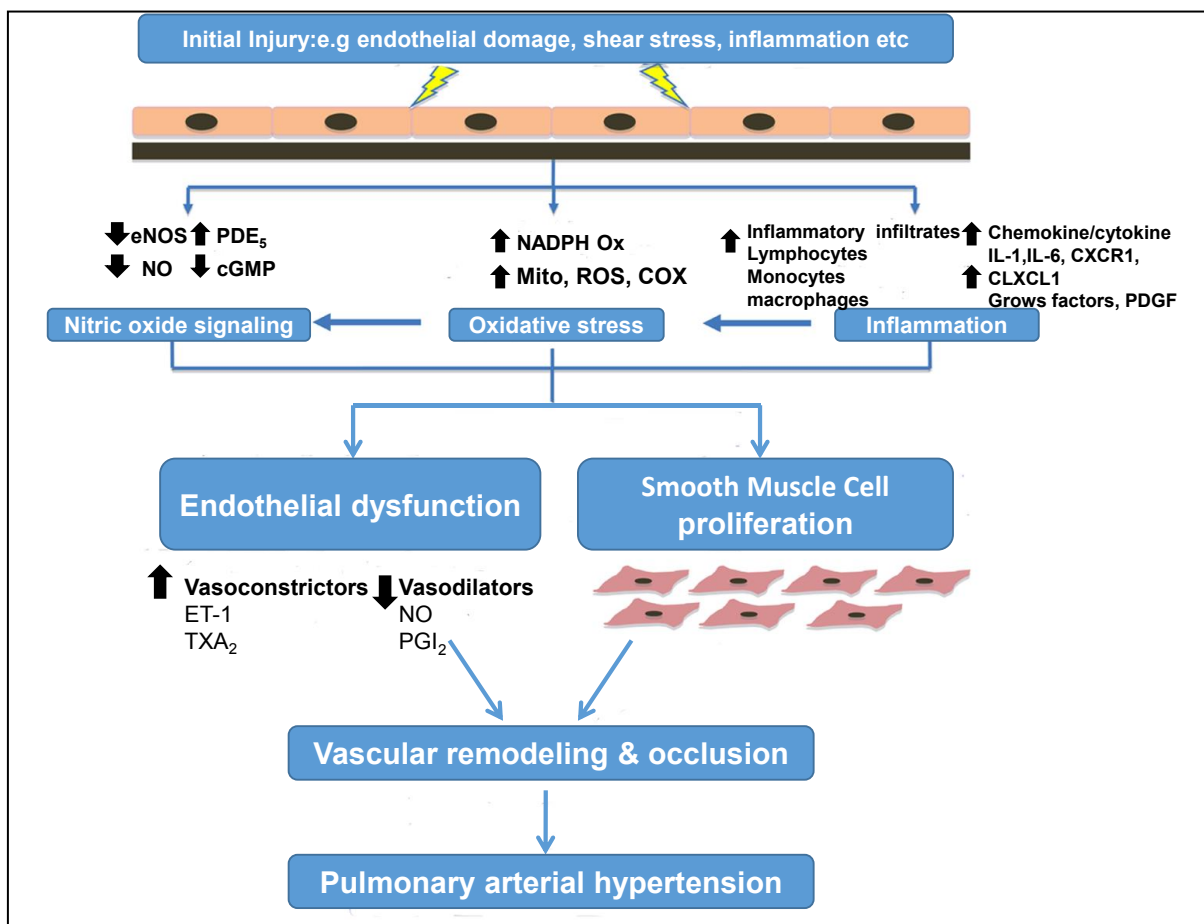


Figure 10 : Monoxyde d'azote, inflammation et stress oxydant dans l'HTAP. Les forces de cisaillement au niveau de la paroi vasculaire et les infiltrats inflammatoires conduisent à un stress oxydatif incluant la NADPH-oxydase et les chaînes mitochondriales (Crosswhite et al., 2010).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées. Ces cellules sont soumises à un phénomène appelé explosion oxydative qui consiste en l'activation du complexe de la NADPH oxydase qui est alors capable d'utiliser de l'oxygène pour produire de grandes quantités d'anion superoxyde dans la membrane cellulaire (Demarco et al., 2010; Mermis et al., 2011; Tabima et al., 2012) (Figure 10). D'autres cellules comme les lymphocytes B possèdent sur leur membrane des systèmes NADPH oxydase similaires qui produisent des radicaux en quantité plus faible comme médiateurs intercellulaires. De plus, les cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le TNF α qui est capable de faire produire des radicaux par la mitochondrie des cellules cibles.

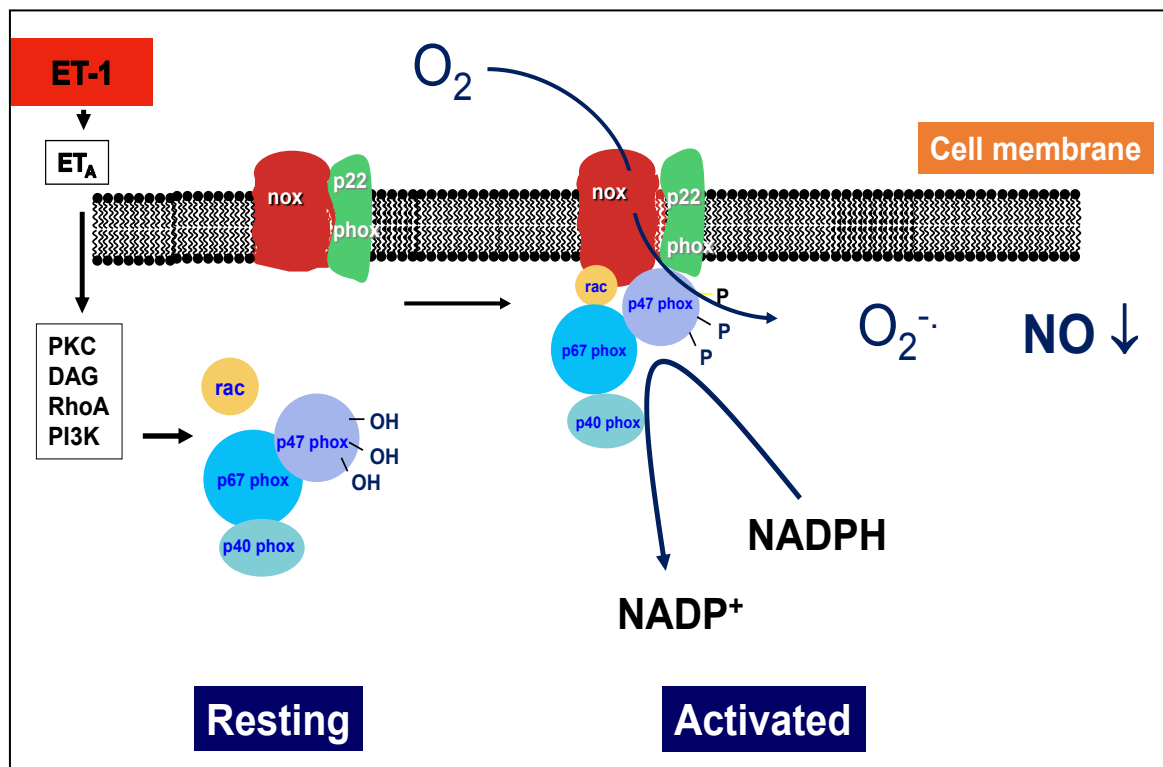


Figure 11: NADPH oxydase, source majoritaire des espèces réactives de l'oxygène dans l'HTAP.
(Schéma réalisé par Said Amissi)

Les principaux radicaux libres impliqués dans le remodelage vasculaire pulmonaire et l'hypertrophie du cœur droit sont l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\cdot) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les ROS agissent soit directement, en tant que vasoconstricteurs (Katusic et al., 1993), soit indirectement en potentialisant les réponses contractiles par la réduction de la biodisponibilité du NO (Crosswhite et al., 2010; Rubanyi et al., 1986) ou par activation des COXs dans les CMLV (Vanhoutte et al., 1988). Divers systèmes enzymatiques incluant les cyclooxygénases, la eNOS découplée, ainsi que la NADPH oxydase produisent des ROS dans les vaisseaux pulmonaires.

4. Répercussion du cœur droit dans l'HTAP

L'importance du ventricule droit (VD) dans le pronostic de l'HTAP a largement été confirmée dans des études de survie où différents paramètres hémodynamiques reflétant la fonction du VD, ont été identifiés comme prédictifs de mortalité : pression dans l'oreille droite, débit cardiaque et index cardiaque (Benza et al., 2010; Humbert et al., 2010). L'ensemble des mécanismes étudiés précédemment conduisent à une augmentation de la PAP et donc à une augmentation de la post-charge du VD. Ces perturbations hémodynamiques ont des répercussions sur la morphologie ainsi que sur le fonctionnement du cœur droit. En effet, l'augmentation de la PAP induit une augmentation du travail du cœur droit, qui se traduit au niveau lésionnel par une hypertrophie concentrique du VD. La défaillance du VD constitue la cause principale de mortalité chez les patients porteurs d'HTAP. Cette hypertrophie adaptatrice va progressivement évoluer vers la défaillance du VD (Champion et al., 2009).

4.1. Physiologie du cœur droit

Le rôle du VD a longtemps été considéré comme négligeable, simple conduit passif entre la circulation veineuse systémique et la circulation pulmonaire. En fait, les progrès dans la compréhension de la physiologie cardiovasculaire ont permis d'établir le rôle prédominant du VD dans le maintien de basses pressions dans la circulation artérielle pulmonaire. Le VD est un acteur majeur de la physiologie circulatoire comme en atteste son rôle pronostique dans de nombreuses situations cliniques telles que l'HTAP chronique, les cardiopathies congénitales, ou bien encore la transplantation cardiaque et l'assistance circulatoire mécanique.

Le VD a une architecture particulière complètement différente de celle du VG, constituée principalement de fibres longitudinales expliquant en partie les mécanismes

d'adaptation. La géométrie du VD normal est complexe et présente 3 faces (inférieure concave, interne convexe et antérieure) et d'après Lillehei, elle se décompose en :

- une chambre d'entrée ou sinus comprenant la valve tricuspide, les muscles papillaires et le *chordae tendineae*;
- une chambre apicale trabéculée ;
- une chambre de chasse ou *conus arteriosus* ou *infundibulum* présentant une paroi myocardique interne lisse (Brittain et al., 2012; Ho et al., 2006) (Figure 12).

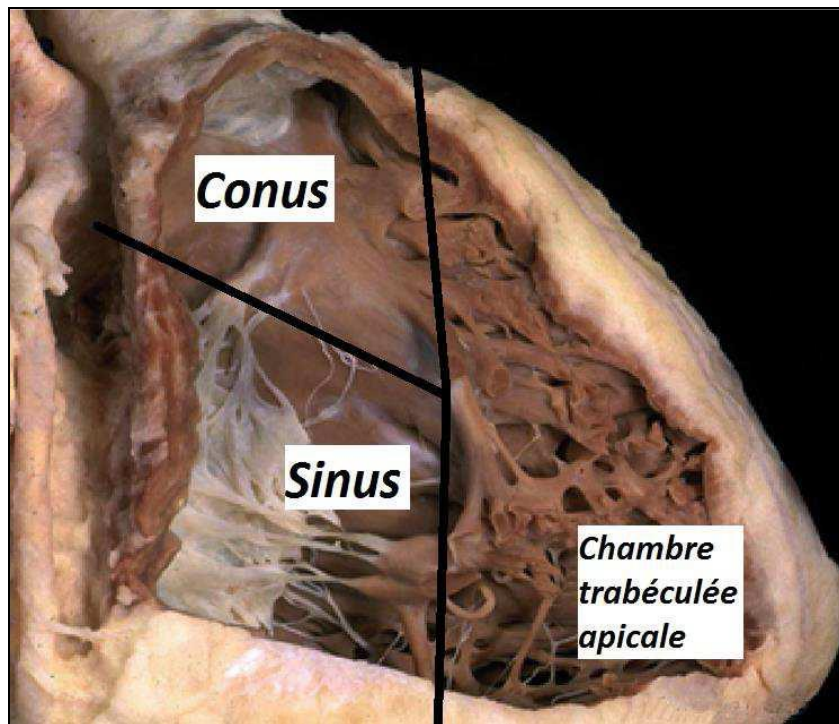


Figure 12: Macroscopie du ventricule droit en coupe sagittale représentant ses 3 chambres : la chambre d'entrée ou sinus, la chambre apicale trabéculée et la chambre de chasse ou conus (Guihaire et al., 2014).

De part sa structure myocardique plus fine et extensible et surtout grâce à sa géométrie particulière, le VD s'adapte facilement aux variations de volume résultant des retours veineux, de la position ou des variations respiratoires, assurant ainsi le maintien d'un débit cardiaque relativement constant (Haddad et al., 2008; Selton-Suty et al., 2009). Lorsqu'il se contracte, le VD se déforme, se raccourcit et peut se décomposer en trois mouvements :

- La contraction transversale (déplacement de la paroi libre du VD vers la cavité ventriculaire droite)

- La contraction longitudinale (raccourcissement du long axe du VD par ascension de l'anneau tricuspide vers l'apex)
- Le mouvement de traction circonférentielle due à la contraction du VG.

La fonction du VD est d'éjecter le sang pauvre en oxygène vers les artères pulmonaires afin qu'il soit réoxygéné dans les poumons. Habituellement, les débits du VD et du VG sont égaux, mais le VD a une charge de travail bien moindre (20 % du travail total du VG) en raison des faibles RVP au niveau des artères pulmonaires (Haddad et al., 2008).

La fonction systolique est déterminée par six facteurs principaux : la pré-charge, la post-charge, la contractilité, la fréquence, la synchronisation et l'apport d'oxygène. Le volume d'éjection systolique et le débit cardiaque, habituellement utilisés pour évaluer la fonction cardiaque, sont des variables dépendantes de ces facteurs. Chez le patient HTAP, les interactions cardio-pulmonaires sont affectées principalement par l'état de remplissage intra-pulmonaire et son impact sur le remplissage du VD.

4.1.1. Pré-charge du ventricule droit

La pré-charge est une pression qui réduit l'entrée de sang dans le VD lors des diastoles en conséquence à une augmentation du volume du VD par dilatation. Physiologiquement, la pression diastolique du VD est comprise entre 0 et 8 mmHg (Greyson et al., 2008). Le VD est exposé à de fréquentes variations du retour veineux, principalement influencé par la cinétique ventilatoire et par les conditions pathologiques affectant les conditions de charge.

4.1.2. Post-charge du ventricule droit

La post-charge est la force de résistance que rencontrent les fibres myocardiques lors de leur contraction. Pour le cœur, cette force est définie comme la tension de paroi ventriculaire maximale en cours de systole. La post-charge est une pression qui réduit la sortie de sang du cœur lors des systoles provoqué par l'épaississement des parois par augmentation de la force d'éjection. L'augmentation de la post-charge est à l'origine de l'adaptation initiale du VD.

4.2. Conséquences sur le cœur droit

Une augmentation de la pression artérielle pulmonaire (PAP) a des répercussions hémodynamiques puis fonctionnelles sur le cœur droit ainsi que sur l'ensemble des structures cardiaques. Ces modifications cardiovasculaires reposent sur des mécanismes cellulaires et

moléculaires complexes au centre de la physiopathologie clinique de l'HTAP (Vonk Noordegraaf et al., 2011). Chez un patient atteint d'HTAP, on observe successivement :

4.2.1. L'hypertrophie ventriculaire droite

Chez le sujet atteint d'une HTAP, les RVP augmentent et les artères pulmonaires perdent leur élasticité. Par conséquent, le cœur est amené à pomper davantage pour essayer de maintenir un débit sanguin constant. L'augmentation de la post-charge est à l'origine de l'adaptation initiale du VD. La relation pression-volume fait que le VD répond à la majoration de la post-charge par une augmentation de la contractilité. Chez les patients HTAP, cette majoration chronique de la post-charge due à une augmentation des résistances vasculaires, conduit à une hypertrophie concentrique du VD, ce qui permet de maintenir un index cardiaque et des pressions de remplissage corrects (Figure 13). Cette adaptation se fait en compensation à une augmentation de la PAPm. L'hypertrophie ventriculaire droite concentrique déclenchée par l'augmentation du stress pariétal, va progressivement compenser l'augmentation d'impédance pulmonaire grâce à l'allongement des sarcomères et à l'augmentation de la synthèse protéique accrue au sein des cardiomyocytes (Klotz et al., 2005). Le stress mécanique est traduit en signaux chimiques intracellulaires par des intégrines (récepteurs d'adhésions cellulaires situés entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette) et à travers des canaux ioniques situés au niveau des cellules cardiaques (myocytes, fibroblastes et cellules endothéliales) (Bogaard et al., 2009; Mann et al., 2004). Ce phénomène est renforcé par les influences neuro-hormonales (comme le système rénine-angiotensine et le système sympathique) autocrine et paracrine. L'hypertrophie de cardiomyocytes nécessite le soutien de la matrice extracellulaire et de la vascularisation (Ingle et al., 2015).

4.2.2. La dilatation ventriculaire droite

Contrairement au ventricule gauche (VG), le VD ne peut pas maintenir très longtemps l'hypertrophie adaptative face à une augmentation soutenue de la post-charge. Nous avons montré que les RVP élevées sont responsables d'une hypertrophie physiologique du VD. D'après la relation de Laplace, toute élévation de la pression endocavitaire s'associe à une augmentation du stress pariétal compensée par une hypertrophie de la paroi. A un stade avancé de l'HTAP, lorsque les RVP et le stress pariétal continuent d'augmenter, le VD va se dilater. La dilatation du VD est un phénomène compensatoire de l'altération de la fraction d'éjection du VD et l'élévation de la post-charge. Cette dilatation progressive du VD a pour

effet direct de réduire la tension s'exerçant sur la paroi libre, et à ce stade, la contractilité n'augmente plus, c'est ce qu'on appelle le découplage du VD (Kret et al., 2007).

4.2.3. La dysfonction ventriculaire droite

Le VD devient progressivement plus sphérique, s'élargit (hypertrophie et dilatation) et le septum interventriculaire s'aplatit jusqu'à devenir paradoxal, ce qui comprime le cœur gauche à cause de l'interdépendance bi-ventriculaire et favorise la dysfonction diastolique du VG. En revanche, une altération de la fraction d'éjection du VG est bien que possible relativement rare (Stool et al., 1974). Les mécanismes possibles impliqués dans la progression de la dysfonction du VD sont l'ischémie, des modifications de l'expression des gènes codant pour les protéines des sarcomères et l'activation du système rénine-angiotensine (Franco et al., 2012). Le stress pariétal chronique favoriserait la surexpression de métalloprotéinases matricielles résultant en un remodelage de la matrice extracellulaire avec un élargissement des espaces entre les cardiomyocytes (Kret et al., 2007). Toutefois, l'élévation anormale de la post-charge reste le principal déterminant du dysfonctionnement du VD chez les patients atteints d'HTAP.

4.2.4. L'insuffisance ventriculaire droite

Il a été également observé chez les sujets atteints d'HTAP, une augmentation de la pré-charge, une élévation des pressions de remplissage du VD et une dysfonction diastolique. Le VD ne peut plus amortir les variations du retour veineux en maintenant le débit pulmonaire constant. L'hypovolémie conduit à une baisse du débit pulmonaire et à une hypoxémie. La diminution du débit cardiaque est également due à l'apparition d'une insuffisance tricuspide provoquée par la dilatation du VD et donc de l'anneau tricuspide (Vonk Noordegraaf et al., 2011).

4.2.5. Le remodelage du ventricule droit

La transition structurale depuis l'hypertrophie concentrique compensatrice jusqu'à la dilatation ventriculaire inadaptée est illustrée dans la Figure 13. Les mécanismes moléculaires de cette transition montre que la réorganisation du cytosquelette jouerait un rôle clé dans l'hypertrophie compensatrice (Ryan et al., 2014). Dans l'insuffisance ventriculaire droite, l'accumulation des ROS associée à l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire par étirement prolonge des sarcomères et va en revanche déclencher la voie mitochondriale de l'apoptose (Watts et al., 2010).

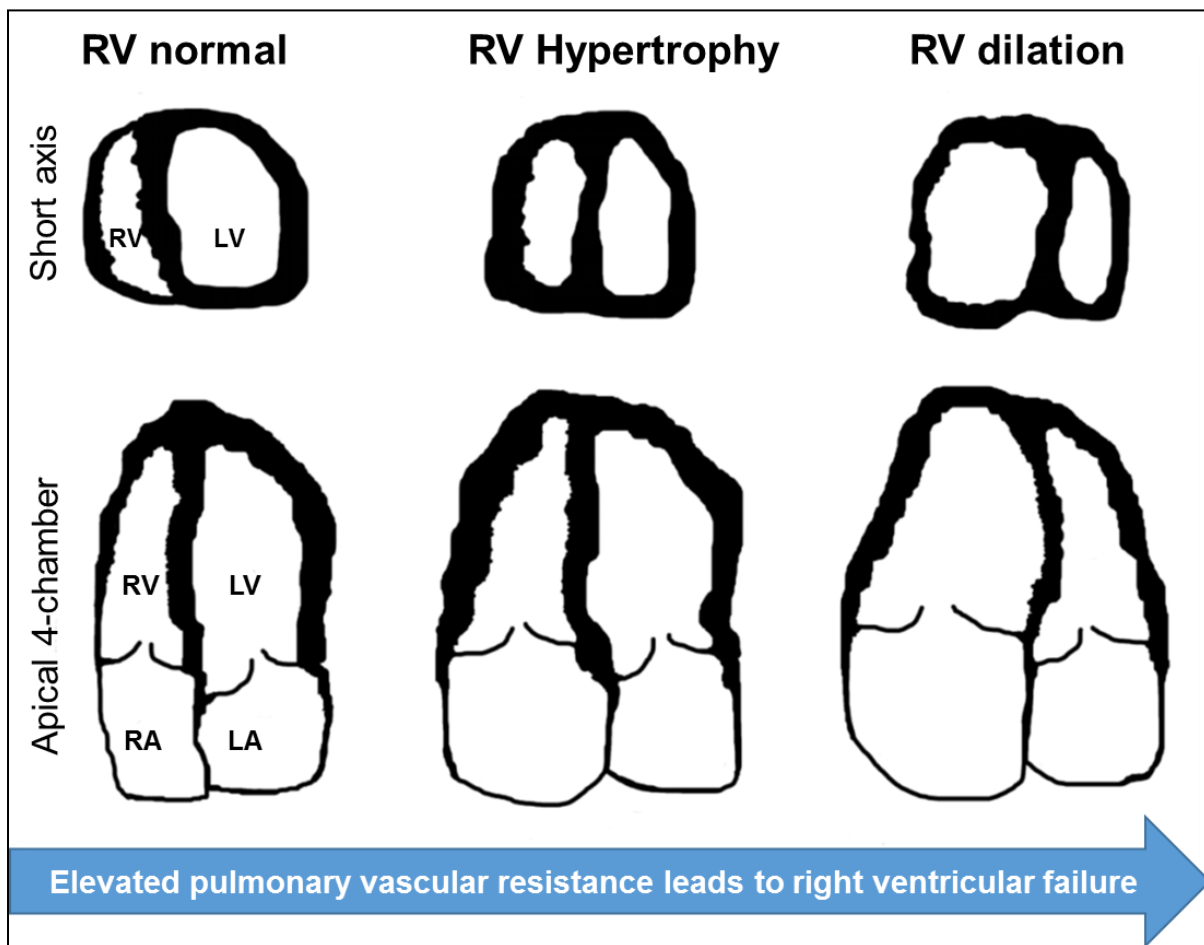


Figure 13 : Représentation schématique du remodelage morphologique du ventricule droit (VD) dans l'hypertension pulmonaire (HTAP). L'épaisseur de la paroi du VD augmente au stade compensé de l'HTAP (hypertrophie concentrique compensée). A un stade plus avancé de la maladie, un remodelage inadapté apparaît sous la forme d'une dilatation du VD pouvant aller jusqu'à restreindre le volume du ventricule gauche (VG) (*Champion et al., 2009*).

Le remodelage des cardiomyocytes et de la matrice extracellulaire participe à la dysfonction progressive du VD. L'augmentation du taux de fibrose myocardique a été rapportée dans les modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque droite, mais également chez les patients souffrant d'HTAP chronique (*Lambert et al., 2015*).

5. Diagnostic de l'HTAP

La symptomatologie de l'HTAP est peu spécifique. Sa mise en évidence repose sur l'utilisation d'examen complémentaires (radiologie, échographie, analyses sanguines, électrocardiographie, angiographie). Les manifestations cliniques reflètent les conséquences cardiaques de l'augmentation de post-charge ventriculaire droite. Le diagnostic d'HTAP repose sur une démarche clinique rigoureuse comportant trois étapes incluant les données de l'interrogatoire, de l'examen clinique et les résultats d'explorations complémentaires :

- Détection et confirmation d'HTAP (diagnostic positif) ;
- Elimination des autres causes d'HTAP et classement en fonction ou non de la présence d'une pathologie associée (diagnostic étiologique) ;
- Evaluation de la sévérité.

5.1. Echographie cardiaque transthoracique

Une échocardiographie transthoracique de bonne qualité est indispensable dans l'évaluation de l'HTAP (Bossone et al., 2007). Elle présente de nombreux avantages car elle est non-invasive, accessible, relativement peu coûteuse et n'a pas d'effets secondaires. C'est donc l'examen de choix dans la pratique clinique pour l'évaluation de la morphologie et de la fonction du VD (Selton-Suty et al., 2009). C'est effectivement un examen de réalisation rapide, qui peut être répété au besoin et parfaitement anodin. On retrouve donc l'échographie cardiaque à toutes les étapes de la prise en charge de l'HTAP :

- Le dépistage dont on connaît l'importance de la précocité : c'est ici l'examen de première ligne ;
- Le diagnostic positif avec mesure de la PAP systolique, PAPm et PAP diastolique ;
- Le diagnostic de gravité avec une évaluation du retentissement VD et une approche de la fonction VD associant des paramètres morphologiques, hémodynamiques (utilisant le Doppler conventionnel ou des technologies plus récentes comme le Doppler tissulaire, l'imagerie de déformation ou l'échographie tridimensionnelle) ;
- L'ETT permet la plupart du temps d'orienter vers le caractère pré ou post capillaire de l'HTAP ;
- Enfin, elle est partie prenante dans le suivi du patient puisqu'elle permet une réévaluation non invasive 3 à 4 mois après l'instauration ou modification du traitement spécifique seule ou en association avec le cathétérisme cardiaque droit en fonction de la clinique du patient.

Malgré tous ces avantages, l'échocardiographie ne se substitue absolument pas au cathétérisme cardiaque droit : c'est lui et lui seul qui pose le diagnostic d'HTAP et qui permet d'instaurer un traitement spécifique. Il est souhaitable qu'il soit réalisé dans un centre de compétence où un test de vasoréactivité doit systématiquement être réalisé.

5.2. Cathétérisme cardiaque droit

Le cathétérisme cardiaque droit est l'examen de référence dans le diagnostic d'une HTAP, mais son caractère invasif limite la répétition de cet examen. Il permet de mesurer avec certitude les PAPm, PAPs, la pression de l'oreillette droite (PAPO), le débit cardiaque et les RVP. Les mesures issues des cathéters se font à débit constant. L'atteinte précapillaire est définie par une PAPm ≥ 25 mmHg sans élévation de la PAPO (≤ 15 mmHg), valeur de la pression capillaire.

Cette mesure peut être affinée par un test de remplissage afin de démasquer une dysfonction gauche diastolique. Dans le cas d'une HTAP confirmée, il est nécessaire d'effectuer un test de vasodilatation par le NO inhalé ou la PGI₂ intraveineuse (époprosténol). En effet, ce test de vasodilatation lorsqu'il est positif (diminution de la PAPm de plus de 10 mmHg avec une PAPm ≤ 40 mmHg et un débit cardiaque normal et/ou élevé) permet de caractériser un sous-groupe de patients qui peuvent bénéficier d'un traitement prolongé par les antagonistes calciques (Galiè et al., 2009).

5.3. Evaluation de la sévérité

L'importance de la dyspnée dans l'HTAP est évaluée par la classe fonctionnelle de la *New York Heart Association* (NYHA) (Tableau 2). Cette classification NYHA permet une estimation de la sévérité du pronostic, puisque les patients en classe fonctionnelle III et IV ont une survie très inférieure à celle des patients en classe fonctionnelle I ou II. Elle représente un outil fondamental au suivi du traitement (Barst et al., 2013). Les autres méthodes d'évaluation de la dyspnée sont le test de marche de 6 minutes avec une distance parcourue inférieure à 332 mètres, la mesure continue de l'oxymétrie (épreuve à l'effort), la fréquence cardiaque et l'évaluation par le patient d'un score de dyspnée.

Tableau 2 : Classification fonctionnelle selon la *New York Heart Association* (OMS, Evian 1998- version modifiée de la classification NYHA) (Cottin et al., 2009)

Classe I	Absence de limitation fonctionnelle pour les activités physiques habituelles; ces activités ne causent pas de dyspnée, de fatigue, de douleur thoracique ou de malaise.
Classe II	Limitation fonctionnelle légère pour les activités physiques, il n’y a pas d’inconfort au repos, mais des activités physiques normales causent de la dyspnée, de la fatigue, des douleurs thoraciques ou des malaises.
Classe III	Limitation fonctionnelle importante pour les activités physiques ; il n’y a pas d’inconfort au repos, mais des activités physiques peu importantes causent de la dyspnée, de la fatigue, des douleurs thoraciques ou des malaises.
Classe IV	Incapacité à réaliser toute activité physique et/ou signes d’insuffisance cardiaque droite. La dyspnée et la fatigue peuvent être présentes au repos et accentuées par toute activité physique.

6. Prise en charge actuelle des patients HTAP

Généralement les patients atteints d’HTAP sont diagnostiqués tardivement. Or, à un stade avancé, l’HTAP est irréversible. Bien que la prise en charge ait considérablement évoluée ces dernières années, il n’existe malheureusement aucun traitement curatif connu à ce jour. Néanmoins, les thérapies actuelles permettent de ralentir nettement la progression de la maladie et d’améliorer le bien-être des patients.

6.1. Traitements conventionnels

Les patients atteints d’HTAP doivent éviter toute augmentation excessive du débit cardiaque. L’activité physique importante est donc contre-indiquée dans l’HTAP sévère, car elle peut aggraver les symptômes (dyspnée, fatigue, douleur thoracique, syncope) (Naeije et al., 2001). La pratique d’un exercice physique minimal est recommandée et une réadaptation à l’effort peut être indiquée (Mereles et al., 2006).

Pour les mêmes raisons, la grossesse est contre-indiquée en raison des modifications hémodynamiques qu’elle induit (Bedard et al., 2009; Jais et al., 2012). L’hypoxémie entraîne une vasoconstriction pulmonaire majorant ainsi l’HTAP (Galiè et al., 2009). Les anesthésies générales ne doivent être réalisées qu’en cas de nécessité absolue, et avec une équipe spécialisée. La vaccination antigrippale et antipneumococcique est fortement conseillée.

À côté des médicaments ciblant la dysfonction endothéliale (antagonistes des récepteurs de l'ET-1, dérivés de la PGI₂, inhibiteurs de la PDE-5) qui seront développés dans le paragraphe 6.2, d'autres types de traitements comme les inhibiteurs calciques, les anticoagulants, les diurétiques sont disponibles (Naeije et al., 2001).

6.1.1. Anticoagulants

Les phénomènes de dysfonction endothéliale et le ralentissement du flux sanguin favorisent la thrombose *in situ* dans les petites artères pulmonaires remodelées. Un traitement anticoagulant est donc recommandé pour diminuer le risque de thrombose *in situ* (Johnson et al., 2006; Olsson et al., 2014). De plus, il a été montré que le traitement anticoagulant permettait de diminuer la mortalité dans l'HTAP idiopathique (Olsson et al., 2014; Rich et al., 1992). En conséquence, les anti-vitamines K, seuls anticoagulants administrables par voie orale et utilisables en traitement de longue durée, sont proposées de manière systématique dans l'HTAP idiopathique lorsqu'il n'existe pas de contre-indications.

6.1.2. Diurétiques

Les diurétiques (furosémide et spironolactone) en association avec un régime sans sel permettent de réduire la volémie, de diminuer la surcharge de pression du VD et d'améliorer la symptomatologie. La posologie doit être adaptée (Naeije et al., 2001).

6.1.3. Oxygénothérapie

Théoriquement, l'hypoxie peut aggraver l'HTAP par augmentation de la vasoconstriction hypoxique. Une oxygénothérapie doit donc être envisagée chez les patients dont l'oxygénation du sang est perturbée, ayant une hypoxie sévère (PaO₂ < 55–60 mmHg) et surtout nécessaire pour la dyspnée d'effort. Cependant, ce traitement est essentiellement symptomatique et ne concerne qu'environ 15 à 20 % seulement des patients atteints d'HTAP (Naeije et al., 2001).

6.1.4. Inhibiteurs calciques

Les inhibiteurs calciques (le diltiazem, la nifédipine ou l'amlodipine) peuvent s'opposer à la vasoconstriction, mais ils n'ont que peu d'effets sur le remodelage vasculaire pulmonaire. Chez certains patients, les phénomènes de vasoconstriction prédominent largement sur les phénomènes de remodelage vasculaire et les inhibiteurs calciques peuvent apporter un réel bénéfice clinique. Les inhibiteurs calciques sont prescrits uniquement chez les patients ayant

répondu positivement au test de vaso-réactivité lors du cathétérisme cardiaque droit (Montani et al., 2010). Ces patients montrent une baisse de la PAPm d'au moins 10 mmHg jusqu'à un niveau inférieure à 40 mmHg avec un débit cardiaque normal ou augmenté au cours de l'inhalation de NO (Sitbon et al., 2014).

En parallèle à ces recommandations générales, plusieurs traitements plus spécifiques de l'HTAP peuvent être proposés comme décrit ci-dessous :

6.2. Traitements spécifiques

Le traitement de l'HTAP tente de s'opposer aux effets délétères de la vasoconstriction, de l'obstruction vasculaire pulmonaire par remodelage et thrombose, et de l'insuffisance cardiaque droite (Sitbon et al., 2014). Les innovations thérapeutiques médicamenteux de ces dernières années (antagonistes des récepteurs de l'ET-1, dérivés de la PGI₂, inhibiteurs de la PDE-5) découlent d'une meilleure compréhension des anomalies physiopathologiques de l'HTAP, en particulier de la dysfonction endothéliale caractérisée par un défaut de production de substances vasodilatatrices et antiprolifératives (PGI₂ et NO) et un excès de production de substances vasoconstrictrices (ET-1 et TXA₂) qui stimulent également la prolifération des CMLV. Les traitements actuels ont pour cible la dysfonction (Figure 14) (Humbert et al., 2004; O'Callaghan et al., 2011).

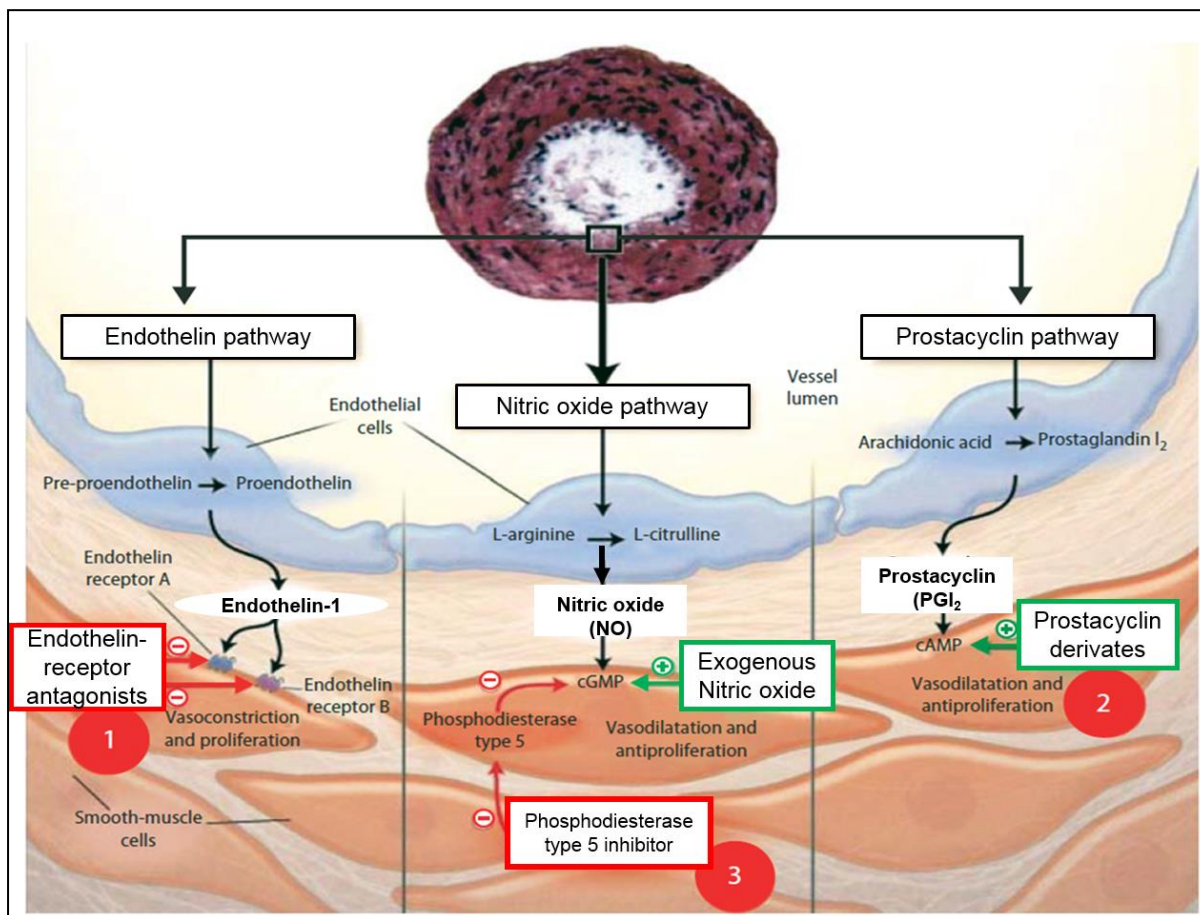


Figure 14 : Principales cibles thérapeutiques dans l'HTAP. Partie supérieure : Coupe transversale d'une artère pulmonaire de petit calibre (diamètre < 500 μm) d'un patient souffrant d'une HTAP sévère montrant une prolifération intimale et une hypertrophie de la média. Partie inférieure : La dysfonction des cellules endothéliales des artères pulmonaires qui se traduit par une diminution de la production de PGI_2 et de NO associée à une augmentation de la production d'ET-1. Ces modifications conduisent à une vasoconstriction et une prolifération des cellules musculaires lisses au niveau des artères pulmonaires. Abréviations : AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ; GMPc : Guanosine monophosphate cyclique ; ET : Endothéline ; $\text{ET}_{\text{A/B}}$: Récepteur A et B de l'endothéline-1; PDE-5 : Phosphodiésterase de type 5 (Humbert et al., 2004).

6.2.1. Antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1

L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur qui favorise la prolifération des CML, contribuant ainsi à l'augmentation du tonus vasculaire pulmonaire et à l'hypertrophie des parois artérielles pulmonaires. Les antagonistes des récepteurs de l'ET-1 sont des médicaments utilisables par voie orale qui s'opposent aux effets délétères de l'ET-1. Ces médicaments inhibent l'activation des récepteurs ET_{A} et ET_{B} des CML des artères pulmonaires et des récepteurs ET_{B} des CE vasculaires pulmonaires (Channick et al., 2004). Une diminution de l'activation des récepteurs de l'ET-1 provoque une réduction de la libération de calcium intracellulaire et par conséquent de la vasoconstriction des artères pulmonaires. En plus de ses effets vasoconstricteurs, l'ET-1 a des fonctions mitogènes et

favorise la prolifération des CMLV pulmonaires (Channick et al., 2004). Les antagonistes des récepteurs de l'ET-1 réduisent aussi les effets pro-mitogéniques de l'ET-1 sur les CMLV pulmonaires.

Le bosentan (Tracleer®) est un antagoniste mixte des récepteurs ET_A et ET_B de l'ET-1. Deux essais contrôlés *versus* placebo (étude BREATHE-1) ont démontré son efficacité chez des patients ayant une HTAP idiopathique ou associée à une sclérodémie en classe fonctionnelle III ou IV de la NYHA (Channick et al., 2001; Rubin et al., 2002). Ainsi, le bosentan améliore après 12–16 semaines de traitement, les capacités à l'effort évaluées par la distance parcourue au test de marche de 6 minutes (TM6) et l'hémodynamique, et allonge le délai avant aggravation clinique (Channick et al., 2001; Rubin et al., 2002). L'évaluation à long terme des patients inclus dans les deux essais contrôlés est en faveur d'une amélioration de la survie sous bosentan par rapport à la survie théorique (McLaughlin et al., 2005). Un autre essai contrôlé (étude EARLY) a montré son efficacité sur la baisse des résistances vasculaires pulmonaires et le délai avant aggravation clinique chez des patients moins symptomatiques, en classe fonctionnelle II de la NYHA (Galiè et al., 2008). La dose recommandée est de 62,5 mg deux fois par jour pendant quatre semaines puis 125 mg deux fois par jour. Le principal effet secondaire est une cytolysé hépatique toujours réversible, survenant dans environ 7 % des cas, ce qui nécessite une surveillance mensuelle des transaminases (Sitbon et al., 2014).

L'ambrisentan (Volibris®) est un antagoniste sélectif des récepteurs ET_A de l'ET-1. Il a été évalué dans deux essais contrôlés (études ARIES-1 et ARIES-2) avec un effet bénéfique observé sur la distance parcourue au TM6, les paramètres hémodynamiques et le délai avant aggravation clinique (Galiè et al., 2005; Galiè et al., 2008). L'ambrisentan est approuvé dans l'HTAP de classes fonctionnelles II et III de la NYHA. Les résultats à long terme sont encourageants avec un maintien à deux ans des améliorations observées dans les études ARIES-1 et ARIES-2 (Oudiz et al., 2009).

Le macitentan (Opsumit®) est un antagoniste mixte des récepteurs ET_A et ET_B de l'ET-1 dont la particularité est d'avoir une très forte affinité tissulaire (Sitbon et al., 2014). Le macitentan a été testé dans la première étude de phase III (étude Séraphin) ayant comme critère principal de jugement le premier événement de morbi-mortalité (décès, transplantation, atriostomie, nécessité de traitement par prostacycline IV ou SC, aggravation clinique de l'HTAP), tous ces événements devant être validés en aveugle par un comité indépendant (Pulido et al., 2013). Les résultats ont montré une réduction de 45 % de survenue du premier

événement de morbi-mortalité (majoritairement une aggravation clinique de l'HTAP) avec la dose de 10 mg une fois par jour par rapport au placebo (Pulido et al., 2013). Le macitentan est approuvé dans le traitement de l'HTAP de classe fonctionnelle II ou III.

6.2.2. Dérivés de la prostacycline

La PGI₂ est produite par les cellules endothéliales et entraîne une relaxation du muscle lisse vasculaire et une inhibition de l'agrégation plaquettaire, par le biais d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). C'est surtout pour ses effets antiprolifératifs sur les CML que la PGI₂ et ses analogues sont utilisés dans le traitement de l'HTAP (Humbert et al., 2004; O'Callaghan et al., 2011).

L'époprosténol est indiqué dans l'HTAP idiopathique, familiale ou associée aux connectivites, en classe fonctionnelle III ou IV de la NYHA. Le traitement par l'époprosténol a prouvé qu'il apportait une amélioration significative des symptômes, des capacités à l'effort évaluées par la TM6, des paramètres hémodynamiques ainsi qu'une réduction de la mortalité (Barst et al., 1996; Sitbon et al., 2002). Du fait de sa très courte demi-vie (3 minutes), la PGI₂ ou l'époprosténol (Flolan[®] ou médicaments génériques) doivent être administrés par voie intraveineuse continue à l'aide d'une pompe connectée à un cathéter sous-clavier tunnelisé (Sitbon et al., 2002). Ce médicament reste le traitement de référence et le seul recommandé pour les formes d'HTAP les plus sévères (classe fonctionnelle IV ou classe III avec critères hémodynamiques de gravité (Galiè et al., 2009). Les effets secondaires du traitement les plus fréquents sont : douleurs des mâchoires, céphalées, diarrhées, flushs, douleurs des membres inférieurs, nausées et vomissements (Barst et al., 1996; Sitbon et al., 2002).

D'autres analogues de la PGI₂ comme le tréprostinil (Remodulin[®]), administré en continue par voie sous-cutanée à l'aide d'une mini-pompe, ou administré par voie intraveineuse continue et l'iloprost (Ventavis[®]) administré par inhalation ont des effets inférieurs à l'époprosténol (Ewert et al., 2007; Hiremath et al., 2010; Simonneau et al., 2002).

6.2.3. Inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5

L'inhibition de la PDE-5 est à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), avec pour conséquence une relaxation du CMLV pulmonaire et une inhibition de la prolifération des CML. Ces médicaments ont permis d'améliorer les symptômes, la tolérance à l'effort, ainsi que la survie (Chaumais et al., 2013). Les inhibiteurs de la PDE-5 comme le sildénafil (Revatio[®]) ou le

tadalafil (Adcirca®) ont l'avantage d'une administration par voie orale et de l'absence d'effets secondaires hépatiques.

6.2.4. Activateur/stimulateur de la guanylyl cyclase soluble

À côté des inhibiteurs de la PDE-5, d'autres moyens ont été développés pour réguler la voie de signalisation du NO. Le riociguat (Adempas®) médicament par voie orale, fait partie d'une nouvelle classe thérapeutique, qui stimule la synthèse du GMPc par activation directe de la guanylyl cyclase soluble (GCs) indépendamment de la production endogène de NO qui est altérée dans l'HTAP. Ce médicament a montré une amélioration significative de la DM6 après douze semaines de traitement aussi bien dans l'HTAP que dans l'HTP post-embolique (Ghofrani et al., 2013).

6.3. Transplantation cardiaque/cardiopulmonaire

Les traitements actuels sont inefficaces, en cas de dégradation de l'état de santé du patient malgré sa prise en charge, la transplantation cardio-pulmonaire ou bi-pulmonaire est alors la seule alternative pour prolonger la survie des patients (Norfolk et al., 2013). La transplantation cardiopulmonaire peut être nécessaire pour des patients ayant une insuffisance cardiaque droite terminale ou une cardiopathie congénitale complexe (Gupta et al., 2015). Selon les dernières données du registre de l'International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), la survie actuelle après une transplantation pulmonaire est d'environ 80 % à 1 an et de 60 % à 5 ans (Christie et al., 2012; Dikalov et al., 2007).

Cependant, il existe une forme d'HTAP, accessible à un traitement chirurgical. Cette forme est due à des obstacles dans les artères macroscopiques par des embolies pulmonaires chroniques. L'endartériectomie peut entraîner une guérison complète.

7. Modèles animaux d'HTAP

Un bon modèle animal d'étude de l'HTAP devrait réunir idéalement un ensemble de caractéristiques comprenant entre autres :

- Une évolution progressive/chronique et sévère ;
- Des atteintes structurelles et fonctionnelles des artérioles pulmonaires résistives (< 500 µm) avec un remodelage intense associé à une hypertrophie médiale, des nécroses fibrinoïdes, des micro-thromboses et des lésions de type plexiformes ;
- Une inflammation chronique avec des infiltrations périvasculaires ;
- Des anomalies biologiques du même ordre que chez l'Homme : diminution des voies de signalisation du NO, de la PGI₂, du BMPR2, avec une augmentation de la production d'ET-1, de facteurs clés de croissance comme PDGF, FGF2, EGF, 5-HT ;
- Une réponse similaire aux traitements.

Plusieurs modèles animaux de la maladie ont été développés et ont permis d'importants progrès aussi bien dans la compréhension de la physiopathologie de l'HTAP que dans la maîtrise et le développement de différentes molécules (Maarman et al., 2013; Stenmark et al., 2009). Comme décrit précédemment, l'HTAP est une pathologie multifactorielle et les modèles actuels ne permettent pas de reproduire tous les aspects de la pathologie avec exactitude, mais chaque modèle permet de mimer un ou plusieurs aspects de la maladie afin de reproduire un type d'HTAP d'intérêt par rapport à un autre.

7.1. HTAP induite par la monocrotaline

Le modèle d'HTAP induite par la monocrotaline (MCT) est le plus utilisé depuis 30 ans et il présente des avantages par sa reproductibilité, son coût et la rapidité de son évolution. Nous avons utilisé ce modèle dans ce travail de thèse afin d'évaluer l'intérêt du traitement chronique de la formulation d'oméga-3 (EPA:DHA 6:1) sur les paramètres hémodynamiques et les altérations cardiovasculaires et pulmonaires induite par l'injection de MCT. La mise en place de ce modèle consiste en l'administration unique sous-cutanée de MCT à la dose de 60 mg/kg chez le rat avec un suivi sur 3 à 4 semaines. La MCT est un alcaloïde toxique de la famille de la pyrrolizidine extraite des graines d'une plante la *Crotalaria spectabilis* (famille des Fabacées) (Figure 15), une plante à floraison annuelle qui pousse dans les régions tropicales et subtropicales (Kay et al., 1967). La toxicité de MCT est essentiellement hépatique (Copple et al., 2004; Meyrick et al., 2001) et à une dose unique plus faible induit

une HTAP chez le rat (Wilson et al., 1992). Les animaux intoxiqués à la MCT présentent des lésions hépatiques nécrotiques et de cirrhose avec œdème hémorragique et de fibrose.

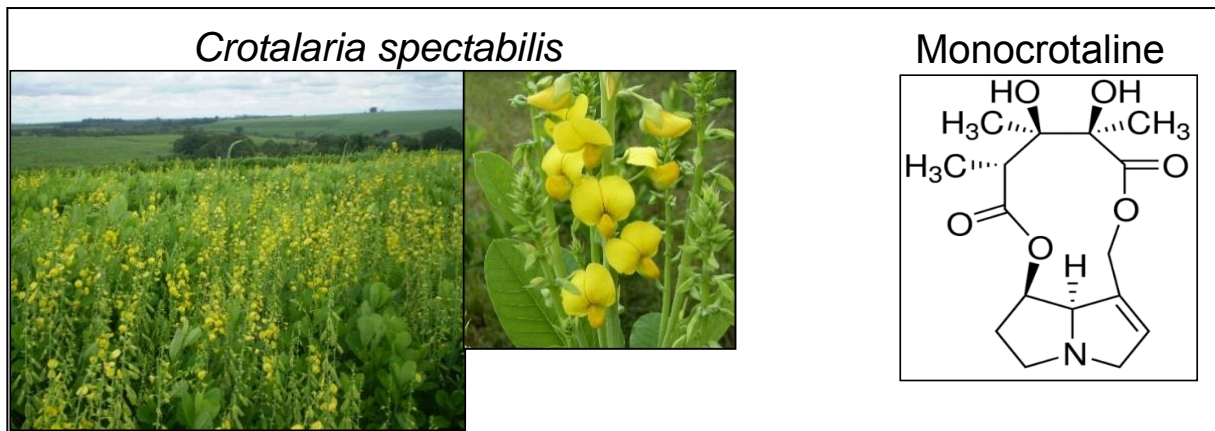


Figure 15 : La plante de *Crotalaria spectabilis* et la molécule de monocrotaline

<https://www.emaze.com>

Le(s) mécanisme(s) précis de la mise en place de cette HTAP expérimentale reste encore très obscur (Gomez-Arroyo et al., 2012). Il serait admis que la MCT est tout d'abord métabolisée dans le foie par les cytochromes P450 mono-oxygénase en MCT pyrrole (MCTP) qui serait le métabolite actif responsable des lésions vasculaires pulmonaires et du développement de l'HTAP expérimentale (Stenmark et al., 2009). Les métabolites actifs de la MCT produisent initialement une nécrose endothéliale (multiples altérations fonctionnelles et structurales des cellules endothéliales) accompagnée d'un œdème pulmonaire de perméabilité visible dans les deux semaines suivant l'injection. L'œdème pulmonaire est associé à une forte inflammation périvasculaire, suivie d'une hypertrophie médiale des artérioles pulmonaires et une muscularisation des artérioles pulmonaires distales conduisant à l'augmentation des RVP et d'une défaillance cardiaque droite (Jasmin et al., 2001; Wilson et al., 1992; Wilson et al., 1989). Il n'y a pas de lésions plexiformes, ni de sclérose intimale (Molteni et al., 1984). L'examen anatomopathologique du cœur montre une cardiomégalie par hypertrophie et dilatation du VD, des degrés variables de fibrose et parfois de congestion pulmonaire ainsi que de la congestion hépatique avec des plages de nécrose centrolobulaire (Miyachi et al., 1993; Naeije et al., 2007). Une augmentation significative des PAPm est constatée dès la deuxième semaine suivant l'administration de cette drogue qui s'aggrave très rapidement chez des rats de 100-150 g : 30 à 50 mmHg à la 3ème/4ème semaine contre 16-18 mmHg chez les rats contrôles. Une importante hypertrophie ventriculaire droite avec

doublément de l'indice de Fulton est constatée (Figure 16). Dès la fin de la 3ème/4ème semaine suivant l'injection de MCT, une importante mortalité est souvent notée.

Le modèle d'HTAP induite par l'injection de MCT est un des modèles classiques d'étude de la maladie car elle ressemble à la forme humaine de par sa gravité hémodynamique, son histopathologie et par sa mortalité naturelle particulièrement élevée. Plusieurs anomalies biologiques similaires à l'HTAP humaine ont été décrites avec des altérations de la voie du NO, de l'ET-1, de la 5-HT et des facteurs de croissance (PDGF, FGF2). Cependant, cette HTAP expérimentale diffère de l'HTAP humaine par sa forte composante inflammatoire, la présence d'anomalies multi-organes avec une toxicité hépatique majeure, une perte précoce de la barrière endothéliale, une évolution très rapide sur quelques semaines et l'absence de lésions plexiformes. Ce modèle animal d'HTAP reste un modèle très utilisé bien que très imparfait de par sa forte composante inflammatoire et de sa grande variabilité. D'importantes variations existent en fonction du lot et de l'âge des animaux utilisés, sachant que des animaux jeunes développent des HTAP plus sévères que des animaux plus âgés.

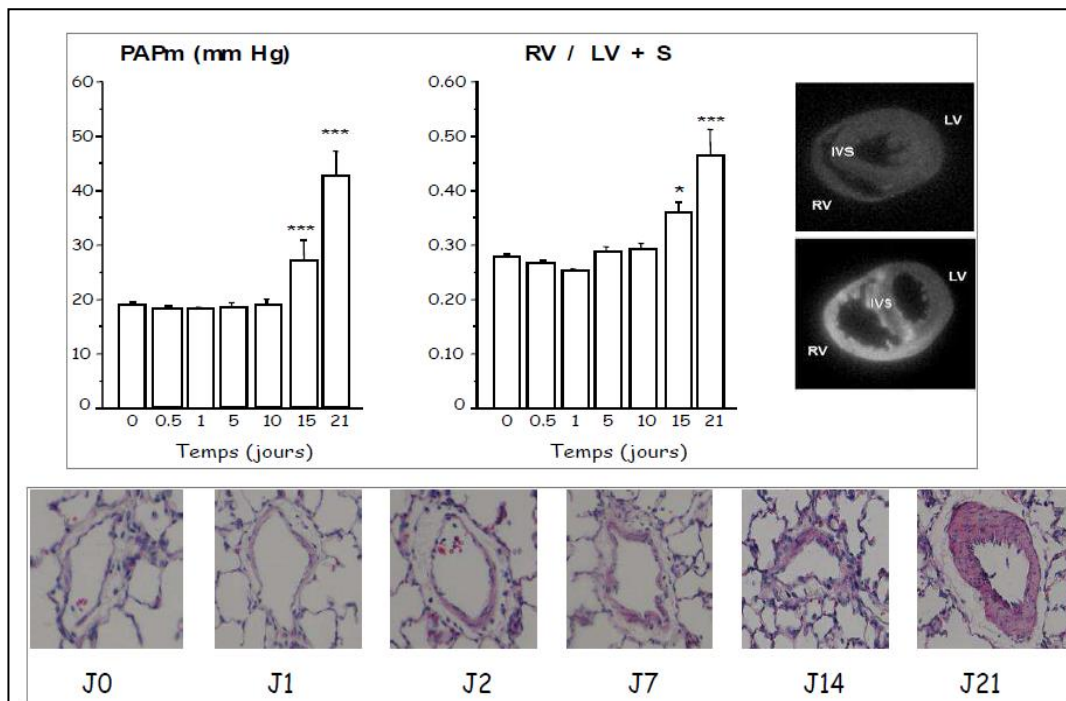


Figure 16: La monocrotaline induit chez le rat une élévation de la PAPm et de l'indice de Fulton, une hypertrophie de la paroi artérielle pulmonaire et ventriculaire droite (Tu et al., 2012).

L'HTAP induite par l'injection de MCT chez le rat peut être prévenue et/ou améliorée par une large gamme de traitements incluant les corticoïdes (Hilliker et al., 1984; Langleben et al., 1985), les analogues de la PGI₂ (Schermyly et al., 2005), l'inhalation continue de NO (Roberts et al., 2000), les inhibiteurs de la PDE-5 (Ghofrani et al., 2004) et les antagonistes pour le récepteur ET_A de l'ET-1 (Jasmin et al., 2001).

7.2. HTAP induite par une hypoxie chronique chez les rongeurs

Ce modèle consiste en l'exposition à l'hypoxie (10 % fiO₂) normobarrique ou hypobarrique de manière chronique (3 semaines au minimum). Il s'agit d'un modèle particulier d'HTAP expérimentale puisqu'il est réversible en quelques semaines (3 à 4 semaines) lors de la remise des animaux dans un environnement normoxique. La réponse vasculaire pulmonaire à l'hypoxie varie d'un sujet et d'une espèce à l'autre. Elle est intense chez le porc, le cheval et le bovin, modérée chez le rongeur, et minime chez le chien, le cobaye, le yak et le lama. Le modèle expérimental d'HTAP hypoxique le plus souvent utilisé recourt chez les petits rongeurs (Grover et al., 2014; Naeije et al., 2007).

L'hypoxie se traduit par une vasoconstriction des CML des artères avec la fermeture des canaux potassiques dépendants du potentiel (dépoliarisation de la membrane plasmique) et l'entrée des ions calcium Ca²⁺. L'exposition à l'hypoxie induit une vasoconstriction pulmonaire suivie d'un remodelage artériolaire conduisant à une augmentation de la pression systolique du ventricule droit (Benzing et al., 1997). Le remodelage artériolaire se limite à une hypertrophie médiale avec quelques proliférations adventitielles mais peu ou pas d'épaississement intimal et peu d'infiltrat inflammatoire. Sur le plan hémodynamique, la pression systolique s'élève modérément à des valeurs de l'ordre de 30-40 mmHg selon la souris. Les animaux en croissance sont les plus sensibles, tandis que les animaux âgés sont relativement préservés de l'HTAP hypoxique. Sur le plan biologique, l'HTAP hypoxique se caractérise par une surexpression intimal d'endothéline-1 et de son récepteur ET_B (Zaidi et al., 2002), de la eNOS (Tyler et al., 1999) et de la synthèse de la PGI₂ (Abe et al., 2001).

7.3. Modèle d'HTAP induite par le Sugén 5416/Hypoxie (SuHx)

Ce modèle consiste en l'administration unique de 20 mg/kg de SU5416 (un antagoniste du VEGF récepteur) avant une exposition à l'hypoxie (10 % fiO₂) de manière chronique (2 à 3 semaines) suivi d'un retour en normoxie (3 à 4 semaines au minimum)

(Taraseviciene-Stewart et al., 2001). Il s'agit d'un modèle sévère d'HTAP expérimentale qui démontre un remodelage intense des artérioles pulmonaires (Figure 17).

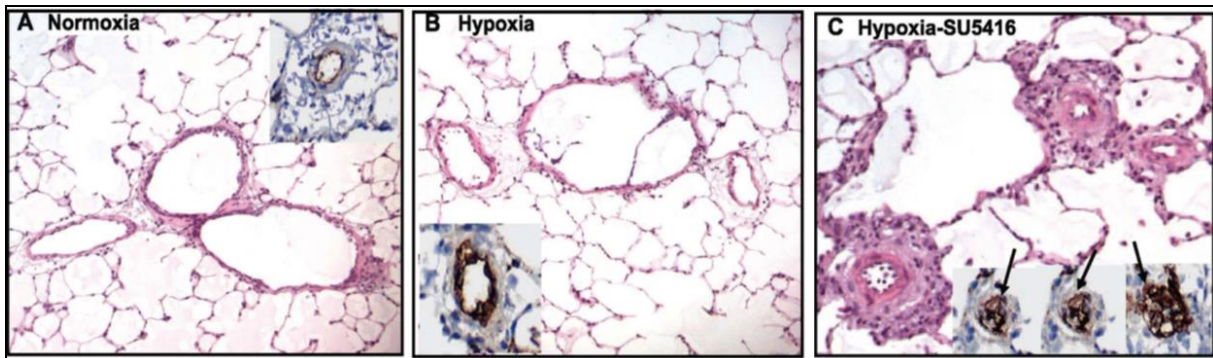


Figure 17 : Comparaison du remodelage des artères pulmonaire sur deux modèles entre l'hypoxie et hypoxie/SU5416

Encore très peu de données sont disponibles concernant ce modèle et sa physiopathologie reste très obscure. Des lésions très sévères avec un remodelage intense touchant aussi bien la media, l'adventice et l'intima sont clairement visibles. Une forte hypertrophie cardiaque est aussi constatée. Cependant, le manque de reproductibilité, des atteintes de plusieurs organes et une mortalité quasi absente sont parmi les principaux points faibles de ce modèle expérimental.

7.4. Modèles animaux d'HTAP sur shunt

L'HTAP sur cardiopathie à shunt est le plus souvent réalisé avec des animaux de grande taille: porc, agneau et veau, bien que quelques travaux soient reportés chez le rat (Ryan et al., 2011; Stenmark et al., 2009). Les HTAP expérimentales sur shunt se limitent à une hypertrophie médiale avec peu ou pas de modifications intimales ou adventicielles. Celles-ci paraissent liées à des durées d'observations limitées à 2 à 4 mois, imposées par la croissance rapide d'animaux de grande taille, tels que le porcelet ou l'agneau, difficile à gérer dans la plupart des animaleries. Une anastomose aorto-pulmonaire synthétique chez le porcelet reproduit en 3 mois d'évolution une HTAP sévère avec hypertrophie médiale. Cette HTAP expérimentale est clairement liée à l'hyper-débit. Comme le diamètre du shunt possiblement réalisable est limité, une anastomose entre l'artère innominée sur le tronc commun des artères pulmonaires ou une ligature d'une des artères pulmonaires peut être également effectuée (modification du shunt de Blalock et Taussig) (Tu et al., 2012). L'ajout du shunt qui va grandir avec l'animal, expose la circulation pulmonaire à des agressions mécaniques croissantes qui permettent d'obtenir des HTAP modérées à graves en 3 à 4 mois (30 à 40

mmHg) (Cao et al., 2015). Quelques travaux ont signalé la présence de lésions complexes proche de lésions plexiformes dans ces modèles. Cependant ces modèles dits d'hyper-débit ne sont généralement pas très inflammatoires et sont des hypertensions pulmonaires réversibles (Huertas et al., 2013).

7.5. Animaux Transgéniques et HTAP

Plusieurs travaux ont signalé des HTAP spontanées chez des animaux génétiquement modifiés. Les rats «fawn-hooded rat» qui présentent un désordre hérité dans le stockage de la 5-HT dans les plaquettes développent lentement une HTAP. Le développement de l'HTAP peut être accéléré par une exposition à l'hypoxie/altitude. De même, les rats transgéniques surexprimant l'angiopoïétine-1 développent une hypertrophie intimale et une HTAP (Chu et al., 2004). A l'inverse, le transfert génique d'un antagoniste du récepteur Tie-2 chez le rat prévient l'HTAP induite par la MCT ou par surexpression de l'angiopoïétine-1, mais ne prévient pas l'HTAP hypoxique (Kido et al., 2005). Des souris surexprimant le 5-HTT, le facteur S100A4(MTS1), l'IL-6 ou des souris déficientes en PPAR γ , VIP, endogline, et ALK1 développent spontanément une HTAP en conditions normoxiques (Jerkic et al., 2011; Toporsian et al., 2010). Plusieurs autres types de souris transgéniques ont été reportées comme soient plus sensibles, soient plus résistantes au développement de l'HTAP expérimentale induite par exemple à l'hypoxie chronique : souris déficientes en BMPR2, en TPH1, en PKC-epsilon, PGI $_2$, eNOS, Smad8 et MCP1 (Ryan et al., 2011; Stenmark et al., 2009). De manière surprenante, les souris transgéniques pour le BMPR2 ne développent pas d'HTAP de manière spontanée. Cependant, ces souris déficientes en BMPR2 sont plus susceptibles à développer une HTAP lorsqu'elles sont soumises à une deuxième «challenge/hit», comme une administration de 5-HT ou de l'hypoxie chronique (Long et al., 2006; Song et al., 2008). Les observations effectuées au travers de ces animaux transgéniques sont informatives puisqu'elles permettent de valider l'importance fonctionnelle d'un facteur ou d'une voie de signalisation dans la physiopathologie de l'HTAP. A quelques exceptions près (souris S100A4(MTS1)), aucune de ces souches de souris ne peut être considérée comme un modèle d'étude de l'HTAP mais plutôt comme des outils d'étude de la maladie, car tous les aspects de la maladie ne sont clairement pas présents dans la même souris.

7.6. Modèle *in vitro*

Bien que les modèles animaux présentent de nombreux avantages pour observer le développement d'un ou plusieurs aspects de l'HTAP, un modèle original *in vitro* a été décrit dans la littérature (Guibert et al., 2005; Morin et al., 2011b). Ce modèle consiste à utiliser des artères pulmonaires humaines saines, disséquées, cultivées à l'incubateur et sur lesquelles une hyperréactivité et/ou une inflammation est induite par un traitement pharmacologique. Ces artères sont ensuite soumises à une stimulation par des agents vasoactifs tels que l'ET-1, le TXA₂ ou la 5-HT afin d'évaluer leur pouvoir contractile (Hiram et al., 2014). Des molécules candidates pour induire la vasodilatation et/ou la résolution de l'inflammation peuvent alors être testées en traitement ou en aigüe pour évaluer leur capacité à normaliser la tension isométrique des artères. Ce modèle a permis de mettre en évidence des voies de signalisation au niveau endothélial et au niveau des CML, impliquées dans la mise en place et le maintien de l'HTAP (Morin et al., 2011b). La limite principale est que ce type d'expérience ne reproduit pas le caractère chronique de la maladie ce qui ne permet pas d'observer le développement d'un remodelage de la paroi ou l'apparition de lésions plexiformes. De plus, s'ajoute la difficulté de travailler avec des artères pulmonaires humaines viables, issues de patients déjà atteints d'HTAP.

8. Impacts des oméga-3 dans l'HTAP

8.1. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3 (AGPI n-3)

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de type oméga-3 et oméga-6 sont indispensables à l'organisme. Ils sont dits essentiels car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent par conséquent lui être intégralement fournis par l'alimentation. Parmi les oméga-3, on distingue l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6n-3) présents en grande quantité dans les poissons gras (le maquereau, le saumon et la sardine) alors que les oméga-6 sont en général présents dans les huiles alimentaires d'origine végétale (Figure 18). Les précurseurs de synthèse des oméga-6 et oméga-3 chez l'animal sont l'acide linoléïque (LA, C18:2n-6) et l'acide α -linoléinique (ALA, C18:3n-3) respectivement.

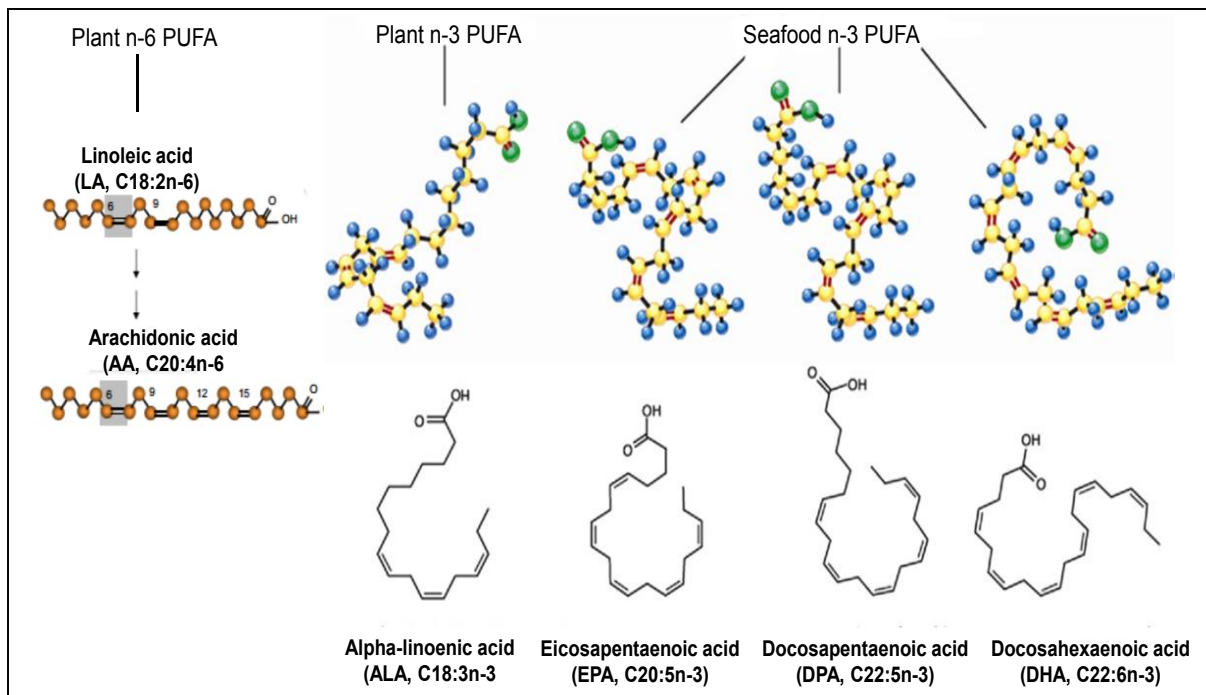


Figure 18: Structure des acides gras polyinsaturés (PUFA) de type oméga-6 et oméga-3 (Mozaffarian et al., 2011).

8.2. Structure et métabolisme des acides gras polyinsaturés

Les AGPI sont identifiés par leur nombre de carbones et de doubles liaisons. Ils ont une extrémité méthylée (-CH₃) dite position oméga et une extrémité carboxylée (-COOH) dite position alpha. En fonction de la position de la première double liaison, on distingue les oméga-6 si la double liaison est placée sur le sixième carbone à partir de l'extrémité méthyle

terminale et les oméga-3 si la double liaison est placée sur le troisième carbone en partant de l'extrémité méthyle terminale.

Parmi les oméga-6, l'acide arachidonique (AA; 20:4n-6) est le précurseur des eicosanoïdes comme les prostaglandines de série 2 (PGE₂, PGI₂, PGF₂), le thromboxane de série 2 (TXA₂) et les leucotriènes de séries 4 (LTB₄, LTD₄) ayant des effets vasoconstricteurs, pro-inflammatoires et mitogéniques (Figure 19) (Schmitz et al., 2008). L'EPA et le DHA sont les précurseurs des eicosanoïdes comme les prostaglandines de série 3 (PGE₃, PGI₃, PGF₃), le thromboxane de série 3 (TXA₃) et les leucotriènes de série 5 (LTA₅, LTB₅, LTD₅) qui ont des effets plutôt anti-inflammatoires et vasodilatateurs, antiagrégants et contribuent ainsi à la protection des artères et du cœur (Adkins et al., 2010; Davidson et al., 2013).

Les oméga-6 et oméga-3 sont métabolisés par les mêmes types d'enzymes par une succession de désaturation et d'élongation (Δ^4 -, Δ^5 - et Δ^6 -). Les cyclooxygénases (COX) produisent les prostaglandines et les TXA₂, les lipoxygénases (LOX) conduisent aux leucotriènes et aux lipoxines (Adkins et al., 2010; Morin et al., 2009).

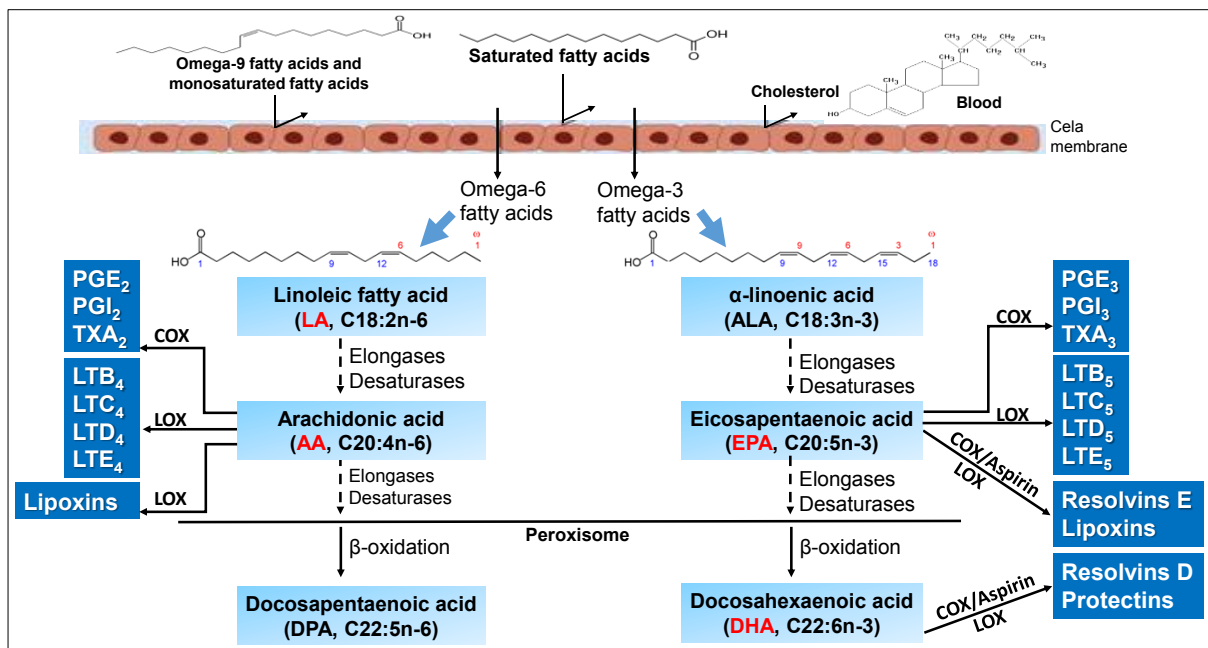


Figure 19 : Voies métaboliques des oméga-6 et oméga-3 et biosynthèse des eicosanoïdes et des résolvines. COX : cyclooxygénase ; LOX : lipoxygénase ; LT : leucotriène ; TXA₂ : thromboxane A₂ (Balanza-Martinez et al., 2011).

8.3. Voie de signalisation des oméga-3

Les acides gras oméga-6 et oméga-3 sont une part intégrale de la membrane cellulaire, et impactent significativement la fluidité membranaire et la fonction cellulaire. Ils servent de constituants majeurs des phospholipides, des triglycérides et des esters de cholestérol (Spector et al., 1999). Les acides gras oméga-3 s'incorporent dans les phospholipides des membranes plasmiques cellulaires et entrent en compétition avec les oméga-6. L'EPA et le DHA peuvent affecter le trafic ou le métabolisme de ces phospholipides ou produire des changements structuraux dans la bicouche lipidique membranaire.

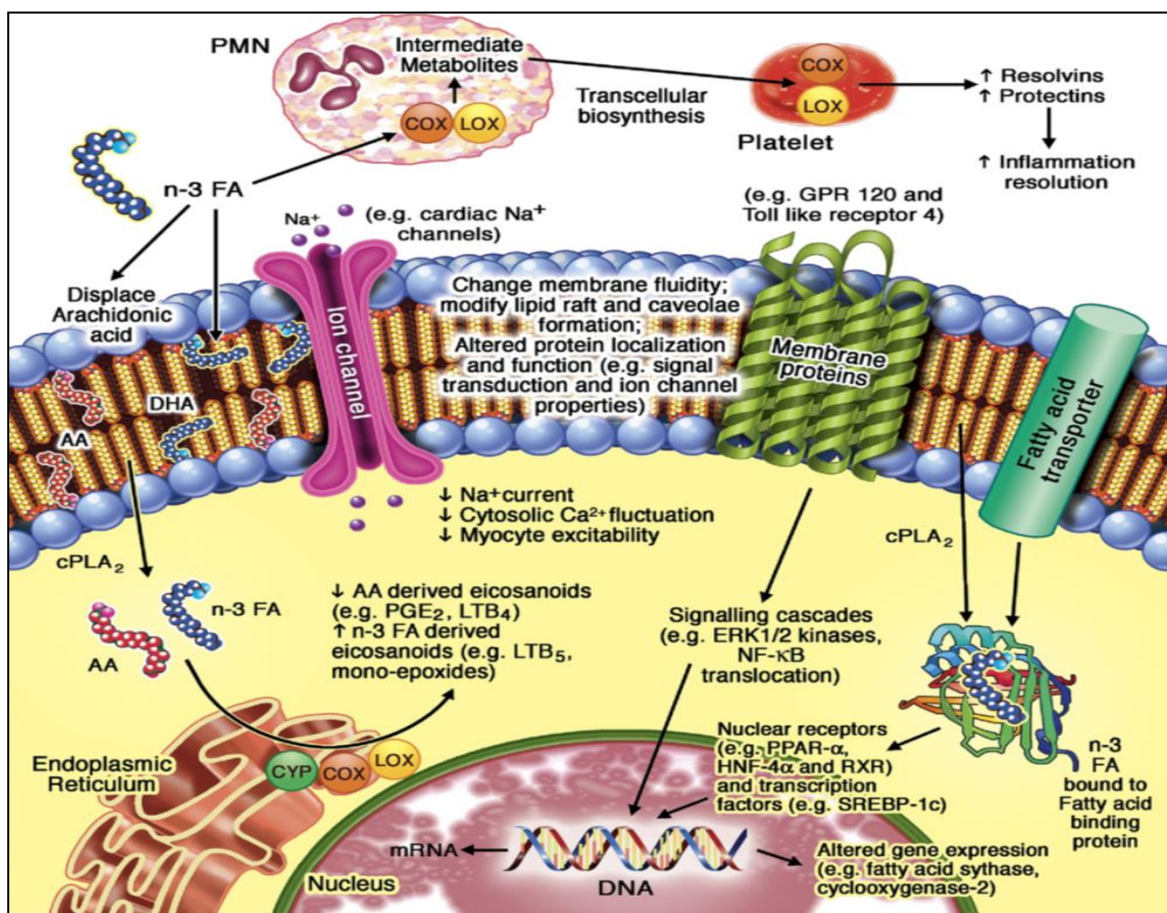


Figure 20 : Voies de signalisations moléculaires possibles de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA). PMN : polymorphonucléaires neutrophiles ; PLA : phospholipase A ; AA : acide arachidonique ; COX : cyclooxygénase ; LOX : lipoxygénase ; CYP : cytochrome (Mozaffarian et al., 2011).

8.4. Oméga-3 et les maladies cardiovasculaires

De très nombreux études épidémiologiques, fondamentales et cliniques ont démontré que la consommation régulière d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne type oméga-3 tels que EPA et DHA exercent des effets bénéfiques potentiels sur la santé en particulier dans les maladies cardiovasculaires (Alter et al., 2011; Auger et al., 2016; Shimokawa et al., 1988). En effet, il a été montré que les oméga-3 ont la capacité dans des modèles animaux de réduire le développement de la maladie athéromateuse (Degirolamo et al., 2010; Shimokawa et al., 1988). De plus, chez l'homme plusieurs études menées avant l'avènement des statines ont également montré que l'administration d'oméga-3 diminuait en prévention secondaire le risque de survenue d'un infarctus du myocarde ou de maladies cardiovasculaires (Kromhout et al., 2012).

Les mécanismes sous-jacents à de tels effets bénéfiques des oméga-3 sont nombreux, notamment l'inhibition compétitive avec l'AA pour sa conversion en eicosanoïdes pro-inflammatoires. Les récentes données de la littérature indiquent que l'effet bénéfique des oméga-3 a été attribué à plusieurs mécanismes et en particulier à leur action favorable sur le profil lipidique, en diminuant la concentration en triglycérides, les risques d'arythmie cardiaque, la réponse pro-inflammatoire, l'agrégation plaquettaire et la pression artérielle ainsi qu'une protection de la fonction endothéliale (Abeywardena and Head, 2001; Cottin et al., 2011; Kromhout et al., 2012).

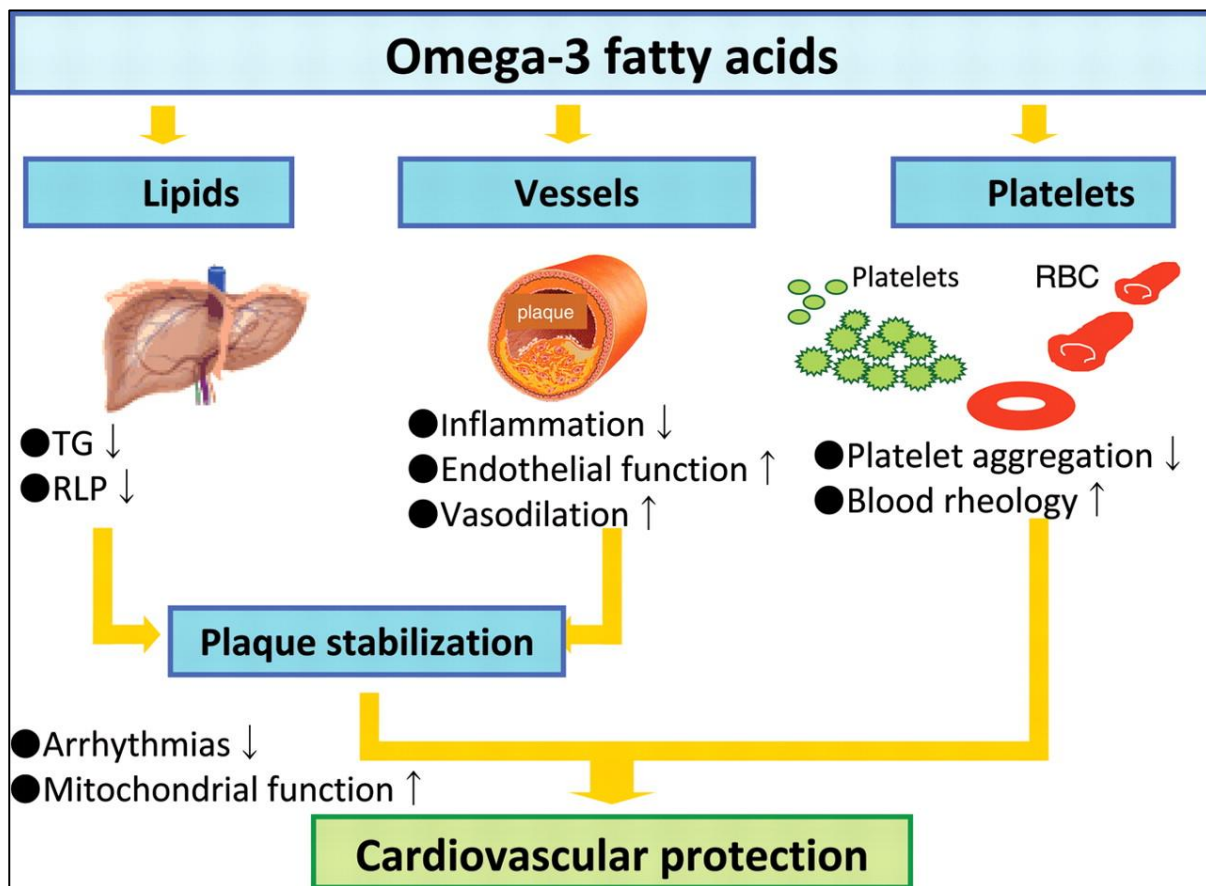


Figure 21 : Effets bénéfiques des oméga-3 (EPA, DHA) sur le système cardiovasculaire. TG : triglycérides ; RLP : lipoprotéines résiduelles ; RBC : globules rouges (Kromhout et al., 2012).

En plus, l'effet bénéfique des oméga-3 sur la réduction de la mortalité cardiovasculaire pourrait être expliqué, au moins en partie, par leur capacité à améliorer la fonction endothéliale jouant un rôle précoce dans l'initiation et le développement des maladies cardiovasculaires (Thiouh et al., 2009; Wang et al., 2012). En effet, les oméga-3 sont capables d'induire des relaxations endothélium-dépendantes en stimulant la formation de monoxyde d'azote (NO) suite à l'activation de la voie PI3-kinase/Akt menant à l'augmentation de l'activité de la NO synthase endothéliale après phosphorylation du site activateur Ser1177 (Shimokawa et al., 1988; Zgheel et al., 2014). Le NO est un puissant vasodilatateur et prévient les réponses pro-inflammatoires, pro-athérosclérotiques et la réactivité plaquettaire. Une étude récente réalisée dans notre laboratoire a montré que la formulation EPA:DHA 6:1 a une activité protectrice sur la fonction endothéliale en augmentant la production de NO, bien supérieure à celle de la formulation EPA:DHA 1:1 (Zgheel et al., 2014).

8.5. Oméga-3 et HTAP

De très nombreuses études ont clairement démontré le rôle bénéfique des oméga-3 sur la fonction cardio-respiratoire et la fonction pulmonaire. Ils réduisent l'apparition de pathologies cardiovasculaires (athérome, infarctus, hypertension artérielle) et améliorent la mortalité du syndrome respiratoire aiguë (SDRA) de l'adulte (Simopoulos et al., 1999). La balance entre les eicosanoïdes dérivés des acides gras oméga-6 (TXA₂, LTB₄) et ceux des oméga-3 (PGI₃, TXA₃, LTB₅) influence l'homéostasie, le tonus vasculaire et l'agrégation plaquettaire au cours de l'agression. Les oméga-3 peuvent ainsi réduire les processus inflammatoires par inhibition des cascades de Toll-Like Receptor (TLR4) et Nuclear Factor kappa B (NF-κB). Les bénéfices des oméga-3 sont liés à l'amélioration de la fonction endothéliale, par accentuation notamment de la vasodilatation endothélium-dépendante (Abeywardena and Head, 2001), et aux effets anti-inflammatoires par modulation de la synthèse des médiateurs lipidiques, de la libération des cytokines et de l'activation des leucocytes, et par ses effets antioxydants. Le DHA a été montré comme pouvant prévenir l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique dans le contexte de l'asthme (Morin et al., 2011a). De plus le 19,20-époxydocosapenténoïque (un métabolite du DHA obtenue par l'époxygénase du cytochrome P450), et MAG-DHA (monoacylglycéride du DHA) diminuent la sensibilité calcique et la prolifération induites par l'ET-1 dans les artères pulmonaires (Morin et al., 2007; Morin et al., 2009). Il a aussi été montré que l'EPA pouvait résoudre l'inflammation dans un modèle allergique d'asthme (Morin et al., 2013).

Chapitre II. Emulsions lipidiques et fonction endothéliale

1. Acides gras

Les acides gras (AG) sont des molécules hydrophobes, acides carboxyliques aliphatiques. Ils sont composés d'une chaîne linéaire carbonée allant de 4 à 28 carbones portant une extrémité méthyle (-CH₃) et une extrémité carboxyle (-COOH). On distingue 3 types d'acides gras en fonction de leur degré d'insaturation : les acides gras saturés (AGS), dont tous les atomes de carbone sont saturés en hydrogène, les monoinsaturés (AGMI), qui comportent une seule double liaison et les polyinsaturés (AGPI), qui possèdent au moins 2 doubles liaisons. Les acides gras sont des principaux constituants des membranes cellulaires, impliqués dans la synthèse des hormones, la signalisation cellulaire, le transport des vitamines liposolubles, interfèrent avec les processus immunitaires et inflammatoires (Guesnet et al., 2005).

2. Indication des différentes émulsions lipidiques

Les lipides constituent la seconde source d'énergie disponible pour la nutrition parentérale. Leur rendement calorique est plus important que celui des glucides : 1 g de lipide apporte 9 kcal. De plus, ils n'ont pas la propriété d'être hyperosmolaires comme les glucides. Les lipides assurent 20 à 40 % des apports énergétiques nécessaires (Thuong et al., 2003). Les acides gras sont administrés sous forme de triglycérides émulsifiés par des phospholipides, d'où la dénomination d'émulsion lipidique. Les émulsions lipidiques (ELI) sont classées selon leurs concentrations en triglycérides de 10 à 30 %. L'administration de mélanges lipidiques est contre-indiquée en cas d'hypertriglycéridémie.

Les ELI ont permis d'améliorer la qualité de la nutrition parentérale. Les ELI permettent un apport de lipides, dont les acides gras essentiels de série oméga-6 et oméga-3, dans le cadre de la nutrition parentérale humaine, lorsque la nutrition orale ou entérale est impossible, insuffisante ou contre indiquée (Chambrier et al., 2006). En effet, les ELI permettent un apport énergétique important en évitant un apport glucidique exclusif et les complications associées dont l'hyperglycémie et la sténose hépatique (Deckelbaum et al., 2004). L'apport d'ELI nutritionnelles s'applique à des patients ayant fréquemment des affections graves (choc septique, malnutrition, infection bactérienne, hypoxie). Ils sont susceptibles d'engager leur

pronostic vital (thrombose, complications métaboliques, hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie) et d'entraîner une morbi-mortalité importante en réanimation (Boisrame-Helms et al., 2013; Boisrame-Helms et al., 2015; Hasselmann et al., 2009).

3. Concept des émulsions lipidiques

Les premières ELI à usage clinique (Intralipide[®]) contenaient des triglycérides à chaîne longue (TCL) dérivés de l'huile de soja, composés principalement d'acides gras polyinsaturés n-6. Les TCM sont des acides gras à chaîne moyenne de 6 à 12 carbones, naturellement présents dans certains aliments comme la noix du coco. De même, les LTC sont des acides gras à chaîne longue de 14 à 18 carbones, présents majoritairement dans l'huile de soja.

Depuis les années 1980, le clinicien dispose de mélanges associant des TCL et des triglycérides à chaîne moyenne (TCM) dérivé de l'huile de coco (Médialipide[®] et Lipidem[®]) reflétant la volonté de diminuer la teneur en TCL riche en oméga-6, capable de perturber la réponse immunitaire, puisqu'ils sont métabolisés en eicosanoïdes dérivés de l'AA (prostaglandines et TXA₂), pro-inflammatoires. (Boisrame-Helms et al., 2015; Calder et al., 2010; Hasselmann et al., 2009). Ces triglycérides ont l'avantage d'être très rapidement oxydés avec une meilleure affinité pour la lipoprotéine lipase, une enzyme qui hydrolyse les triglycérides contenus dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et les chylomicrons. Ils sont stockés en moindre quantité dans les tissus, améliorant ainsi leur apport énergétique (Chambrier et al., 2006).

Plus récemment encore, des émulsions lipidiques remplaçant partiellement les acides gras polyinsaturés n-6 par l'huile d'olive, un acide gras monoinsaturé n-9 (ClinOleic[®]) ou d'huile de poissons à base d'oméga-3 comme EPA et DHA (Omegaven[®]) sont disponibles (Goulet et al., 2010; Waitzberg et al., 2006). A la différence des acides gras polyinsaturés n-6, l'EPA et le DHA entrent en compétition avec le métabolisme de l'AA au niveau enzymatique (cyclooxygénase, lipoxygénase) et donnent des eicosanoïdes de la série 3 moins pro-inflammatoires.

4. Controverse des émulsions lipidiques

En effet, les ELI de nutrition parentérale, connues pour moduler les réactions inflammatoires et l'immunité de façon plus ou moins marqué selon la nature des acides gras qui les composent, pourraient avoir un effet bénéfique chez les patients en état d'agression, tandis que d'autres émulsions seraient au contraire délétères (Calder et al., 2013). Bien que

très utilisée, la nutrition parentérale par les ELI comporte de nombreuses complications qu'il est nécessaire de connaître. Nous nous sommes intéressés aux complications métaboliques liées à la composition des ELI apportées. Ainsi, l'apport des lipides est potentiellement responsable d'hypertriglycémie, d'hypercholestérolémie et de thrombose et contribue à remodeler les artères coronaires. L'altération de la fonction endothéliale résulte à une diminution de la production du NO, associée à une exacerbation des réponses inflammatoires, du stress oxydant (Gosmanov et al., 2012; Steinberg et al., 1997).

5. Intérêt des oméga-3 dans la nutrition parentérale

L'arrivée des ELI à base d'oméga-3 a révolutionné la nutrition parentérale. Les ELI sont utilisées pour fournir d'énergie dans la nutrition artificielle des malades en état d'agression. La plupart de ces patients présentent un état hyper-inflammatoire comme dans le cas du sepsis, responsable d'un déséquilibre des défenses anti-oxydantes, d'une altération de la fonction immunitaire et vasculaire. Dans ce contexte, l'immuno-nutrition consistant en l'administration par voie parentérale de nutriments spécifiques, comme les acides gras oméga-3, en quantité supérieure à la normale dans le but d'améliorer les fonctions immunitaires et endothéliale, pourrait avoir un intérêt (Calder et al., 2012). En effet, les AGPI n-6 sont ainsi métabolisés en eicosanoïdes pro-inflammatoires dérivés de l'AA, tandis que les AGPI n-3, comme l'EPA et le DHA entrent en concurrence avec le métabolisme enzymatique de l'AA. Les eicosanoïdes dérivés de l'EPA sont donc moins pro-inflammatoires que ceux synthétisés à partir de l'AA. Les AGPI n-3 diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires, augmentent la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (Calder et al., 2013), diminuent la production leucocytaire de ROS et conduisent à la libération de résolvines qui participent au contrôle endogène de l'inflammation (Wanten et al., 2006). Enfin, les oméga-3 stabilisent le complexe NF- κ B/I κ B supprimant ainsi l'activation des gènes impliqués dans le processus inflammatoire (Zhao Y et al., 2004).

OBJECTIF DES ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

1. Hypothèse

Nous avons vu à travers ce travail bibliographique que la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire pulmonaire sont deux concepts majeurs au cœur de la recherche des nouveaux médicaments dans l'HTAP. L'inflammation et le stress oxydant sont des acteurs déterminants à l'origine de l'altération fonctionnelle et structurelle du lit vasculaire pulmonaire menant au développement de l'HTAP, mais qui ne sont actuellement pas systématiquement ciblés dans les traitements proposés aux patients. Les réponses pro-inflammatoires associées au stress oxydant activent la prolifération des CMLV pulmonaires et induisent une dysfonction endothéliale pulmonaire.

L'EPA et le DHA présentent des effets protecteurs de la fonction endothéliale dans un modèle d'asthme *in vitro* et des effets anti-inflammatoires dans un modèle d'HTAP à l'hypoxie chronique. L'EPA et le DHA possèdent un potentiel thérapeutique considérable dans les maladies cardiovasculaires par une diminution de la pression artérielle et une amélioration de la fonction endothéliale attribuées à leurs propriétés vasoprotectrices, anti-inflammatoires et anti-oxydantes.

2. Objectif du projet

L'HTAP est marquée par une hyperactivité des vaisseaux, une augmentation de la prolifération et migration cellulaire, un remodelage intense des artérioles pulmonaires et une forte expression de marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant.

Mon travail de thèse a pour premier objectif d'évaluer le potentiel de la formulation EPA:DHA 6:1 à prévenir l'élévation des pressions pulmonaires et les altérations cardiovasculaires et pulmonaires dans un modèle d'HTAP expérimentale induite par l'injection de MCT chez le rat. Par conséquent, nous rechercherons à déterminer les mécanismes sous-jacents en particulier liés à la vasoprotection par la production de monoxyde d'azote (NO) et à l'inhibition des réponses inflammatoires et du stress oxydant.

Un deuxième objectif de notre étude est d'évaluer l'impact des émulsions lipidiques de la nutrition parentérale sur la fonction endothéliale dans un modèle de vaisseau sanguin isolé et de déterminer si le rôle du stress oxydant et des prostanoïdes vasoconstricteurs.

MATERIELS ET METHODES

Etude 1

1. HTAP induite par injection de monocrotaline chez le rat

Toutes les expérimentations ont été approuvées par un comité d'éthique local et conduites avec des rats mâles de souche Wistar d'un poids compris entre 100 à 120 g (Janvier, Le Genest-Saint-Isle) maintenus dans des conditions d'élevage standard. Les animaux sont élevés dans des conditions constantes de température et d'humidité avec des cycles de 12 heures de jour/12 heures de nuit ; ils reçoivent de l'eau et sont nourris *ad libitum*.

Les rats ont été randomisés et repartis en 4 groupes (n= 7-13 rats) (control, EPA:DHA 6:1, MCT, MCT + EPA:DHA 6:1).

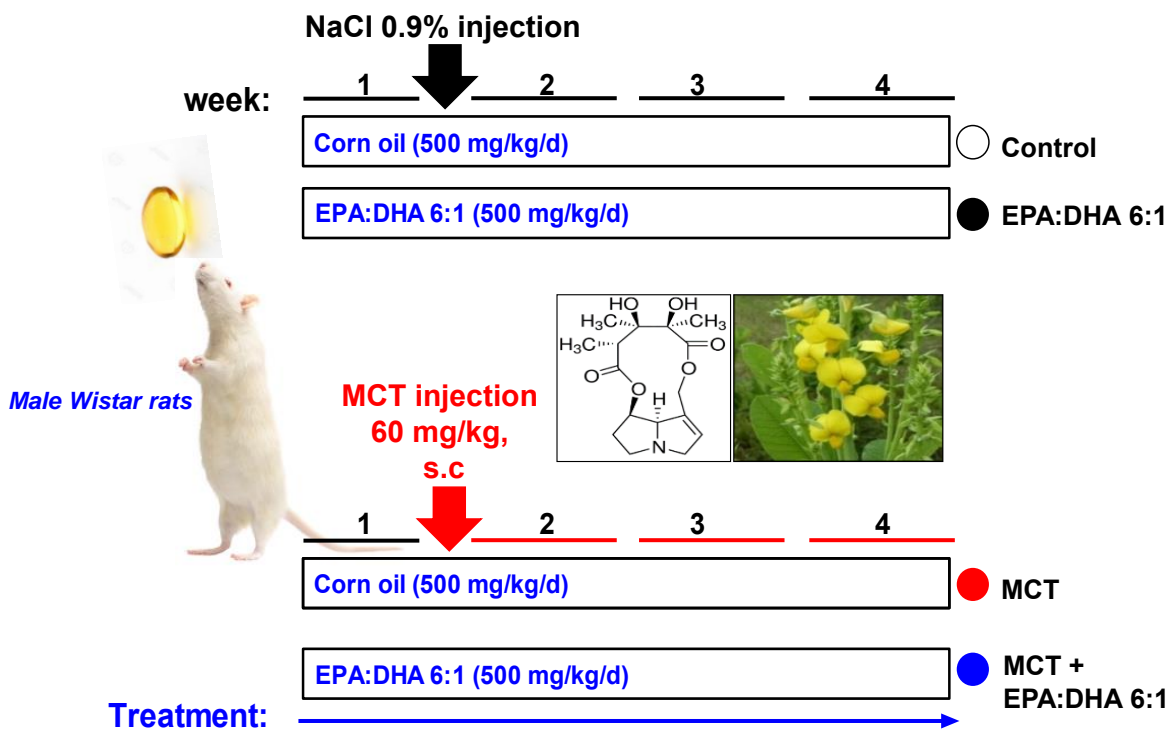


Figure 22 : Protocole expérimental pour le traitement préventif de l'HTAP induite par la MCT chez le rat.

Les rats sont traités pendant 4 semaines par gavage suivant leur groupe de randomisation soit avec l'huile de maïs soit avec le mélange EPA:DHA 6:1 à 500 mg/kg/j (équivalent à 5.6 g/j chez l'homme de 70 kg). Après un prétraitement d'une semaine, une injection unique sous-cutanée de 60 mg/kg de MCT ou de NaCl 0.9 % est réalisée chez les rats, suivie d'un post-traitement de 3 semaines des rats *per os* avec les mélanges d'huiles. La MCT est diluée dans une solution d'un volume équivalent d'HCl 1M et de NaOH 1 M pH 7,4. Les animaux sont pesés toutes les semaines pour ajuster les traitements.

Au 21^{ème} jour suivant l'injection de MCT, l'évaluation de l'HTAP a nécessité :

- L'étude des paramètres hémodynamiques avec la mesure de la pression systolique du VD (RVSP) et de la PAPm ;
- La quantification de l'hypertrophie du VD par le calcul de l'indice cardiaque de *Fulton* : rapport du poids du VD sur la somme de poids du ventricule gauche (VG) + septum (S) [$VD/(VG + S)$];
- L'étude immunohistochimique et d'immunofluorescence sur des coupes de poumons et de cœur avec la quantification du remodelage des artérioles pulmonaires d'un diamètre inférieur à 50 μ m et des cardiomyocytes du VD, de l'inflammation et du stress oxydant associés au remodelage cardio-pulmonaire ;
- L'étude de la réactivité vasculaire de l'artère pulmonaire principale et l'artère mésentérique secondaire pour apprécier la fonction endothéliale vasculaire pulmonaire et systémique.

1.1. Les paramètres d'hémodynamiques

1.1.1. Echocardiographie transthoracique (ETT)

L'échocardiographie avec Doppler est l'examen non invasif de référence pour diagnostiquer l'HTAP. Il permet de déterminer les modifications fonctionnelles et morphologiques du cœur et de l'artère pulmonaire par la mesure des épaisseurs pariétales et des diamètres cavitaires. Il permet également d'estimer les pressions artérielles pulmonaires, le débit cardiaque et les résistances vasculaires pulmonaires. Les données morphologiques et fonctionnelles du VD et de l'artère pulmonaire sont d'une importance primordiale pour évaluer l'HTAP. Elles sont recueillies en échocardiographie (Sonos 5500, Philips, USA) avec une sonde classique de 12 MHz. L'ETT était réalisée sous anesthésie des rats avec le pentobarbital (50 mg/kg). Des boucles correspondant à 3 cycles cardiaques consécutifs ont été enregistrées en télé-diastole et télé-systole. Nous avons enregistré en

modes d'acquisition 2D, TM, Doppler pulsé, Doppler continu et Doppler couleur en incidence :

- Coupe parasternale grand axe et petit axe ;
- Coupe apicale 2 et 4 cavités centrée sur le VD ;
- Mode Doppler pulsé au niveau de la chambre de chasse du VG sous-aortique ;
- Mode Doppler pulsé et couleur au niveau de la valve tricuspide permettant de quantifier l'insuffisance tricuspидienne ;
- Mode Doppler continu permet l'analyse du flux d'insuffisance tricuspидienne ;
- Mode TM permet la mesure des épaisseurs de paroi cardiaque et de diamètres des cavités ventriculaires sur un cycle de temps, comme les diamètres télésystoliques et télédiastoliques permettant la mesure de la fraction de raccourcissement surfacique du VD ou les diamètres de la veine cave inférieure ;

A partir de ces acquisitions, nous avons déterminé :

- Des paramètres d'évaluation de la fonction ventriculaire droite :
 - Les dimensions cavitaires du VD et du VG à partir d'une coupe parasternale petite-axe ;
 - La fraction de raccourcissement surfacique : *Fractional area change* du VD (FAC), calculée à partir de la surface télé-diastolique et de la surface télé-systolique obtenues en coupe 4 cavités : $FAC (\%) = [(Surface\ télé-diastolique\ du\ VD - Surface\ télé-systolique\ du\ VD) / Surface\ télé-diastolique\ du\ VD]$. Il s'agit d'un indice de fonction systolique reproductible qui est bien corrélé à la survie des patients dans l'HTAP ;
 - Le gradient de la vélocité maximale de la régurgitation tricuspидienne (TRV) à partir du Doppler continue et couleur.
- Des paramètres d'évaluation du remodelage de l'artère pulmonaire :
 - Le flux d'éjection pulmonaire ;
 - L'intégrale temps-vitesse (ITV, cm), le temps d'accélération de l'artère pulmonaire (PAAP, ms), la pulsatilité (%), et les RVP calculées suivant la formule : $RVP = V_{max} / ITV$ sous-pulmonaire (unité wood).
- Un paramètre d'évaluation de la fonction ventriculaire gauche :
 - Débit cardiaque indexé (en ml/min) à partir de l'ITV sous-aortique mesuré en Doppler pulsé au niveau de la chambre de chasse en coupe apicale 5 cavités.

La sévérité de l'HTAP est déterminée en utilisant le Doppler continue et couleur pour estimer la pression artérielle pulmonaire systolique (PAPs) en mesurant la vitesse maximale de l'insuffisance tricuspidiennne (V_{maxIT}) au niveau la valve tricuspide. La V_{max} d'une IT permet de calculer la différence de pression qui règne entre le VD et l'OD en systole par l'équation simplifiée de Bernoulli : $\Delta P = 4 \times V_{maxIT}^2$. Le V_{max} est mesuré sur le tracé spectral qui présente la valeur la plus élevée et l'enveloppe la mieux définie. La pression systolique du ventricule droit (PVDs ou RVSP) est évaluée en ajoutant à ce gradient une estimation de la pression auriculaire droite (POD). La POD est déterminée en évaluant le % de cooptation de la veine cave inférieure (VCI) en inspiration (collapsibilité de la VCI). En l'absence de sténose pulmonaire, la PAPs = PVDs = $4 (V_{maxIT})^2 + POD$. On considère qu'il existe une hypertension pulmonaire lorsque la PAPs est supérieure à 35 mmHg au repos avec des pressions de remplissage VG basses.

1.1.2. Cathétérisme cardiaque droit

La PAPm est mesurée par un cathétérisme cardiaque droit. Les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (50 mg/kg). La PAPm a été mesurée grâce à un cathéter relié à un capteur de pression externe. Le cathéter est introduit dans la veine jugulaire, puis remonté à travers l'oreillette droite et le VD et placé dans l'artère pulmonaire où la mesure de la PAPm a été réalisée. Le cathéter a été retiré et réinséré une deuxième fois dans l'artère pulmonaire afin d'obtenir des mesures sur deux plages d'au moins une minute. La PAPm a ensuite été moyennée sur ces deux plages de mesures. Les pressions artérielles systémiques sont mesurées par cathétérisme de l'artère fémorale.

1.2. Etude de l'hypertrophie du ventricule droit

L'hypertrophie du VD est un marqueur de sévérité de l'HTAP induite par la MCT. L'hypertrophie du VD est déterminée par la majoration de *l'indice de Fulton* qui s'établit en calculant le rapport du poids du VD sur la somme des poids du ventricule gauche (VG) et septum (S) : $[VD/(VG + S)]$ et du rapport VD sur le poids corporel de l'animal $[VDW/BW]$ (en comparant aux animaux témoins).

1.3. Immunohistochimie

Les poumons sont insufflés avec une solution de formaldéhyde à 4 % via la trachée et incubés avec cette même solution pendant 48 h. Ils sont ensuite déshydratés dans des solutions d'alcool et de toluène successivement puis inclus en bloc de paraffine. Des coupes

histologiques de 4 µm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). Les noyaux apparaissent en noir, tandis que le cytoplasme, les muscles, les fibres de collagènes et les érythrocytes sont colorés en rose.

Les marquages immunohistochimiques avec l'anti- α -actine (1/20000), anti-CD68 (1/1000) et anti-CD3 (1/500) sont effectués sur des coupes paraffinées de 4 µm. Les lames sont d'abord déparaffinées puis réhydratées. Le démasquage d'antigènes se fait dans une microonde 2 x 5 min dans un tampon citrate. L'activité de la peroxydase endogène est bloquée par de l'eau oxygénée à 3 % (peroxyde d'hydrogène). Les coupes sont incubées en présence de l'anticorps primaire dilué dans du sérum bloquant (sérum du cheval 2 % dans du PBS-triton) pendant la nuit à température ambiante ; puis en présence d'anticorps secondaire biotinylé pendant deux heures. Le complexe streptavidine biotine peroxydase est incubé pendant 30 min, le chromogène utilisé est le VIP (Vector Laboratories). Les coupes sont contre-colorées au vert de méthyle, séchées et montées en Eukitt.

1.4. Marquages immunofluorescence

Des sections transversales de 7 à 14 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryostat à -20°C puis récoltées sur des lames silanisées. Les lames sont ensuite placées à température ambiante dans une chambre humide et fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % pendant 30 min, puis lavées avec du PBS (*phosphate buffered saline*). Les coupes sont incubées en présence de l'anticorps primaire pendant la nuit à 4 °C après saturation au BSA à 5 % (Bovine serum albumin). Après lavages, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est utilisé pour reconnaître la protéine cible. Les sections sont montées avec du DAKO et examinées avec un microscope confocal (Leica TCS SP2 UV DM IRBE ; Leica microsystems, Wetzlar, Germany).

1.5. Mesures de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Des sections transversales de 25 µm d'épaisseur sont récoltés sur les lames silanisées à l'aide de cryostat à -20 °C à partir des poumons congelés. Les lames sont ensuite placées à température ambiante dans une chambre humide. La sonde fluorescente dihydroéthidium (DHE) à 2.5 mM est appliquée durant 30 min. Afin de caractériser les sources potentielles des ROS, nous avons utilisé différents inhibiteurs enzymatiques 30 minutes avant et durant l'application de la DHE.

1.6. Résonance paramagnétique des électrons (RPE)

1.6.1. Principe

La RPE est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique permettant d'obtenir des informations concernant la nature des espèces magnétiques d'un échantillon, ainsi que des informations sur leurs concentrations. Son principe est analogue à celui de la résonance magnétique nucléaire (RMN), à la différence près qu'en RPE, ce sont les électrons qui sont excités plutôt que les noyaux atomiques. Grâce à sa spécificité et sa grande sensibilité, elle permet une détection directe des espèces magnétiques (radicaux libres, sels et complexes de métaux de transition etc.) caractérisées par la présence d'un électron non apparié sur la couche de valence.

1.6.2. Utilisation de sonde (« SPIN PROBE »)

Récemment, des sondes de la famille des hydroxylamines ont été développées, dont le 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine ou CMH (Figure 23). Les hydroxylamines présentent l'avantage de réagir beaucoup plus rapidement avec l'anion superoxyde que les spin trap de la famille des nitrons (Dikalov et al., 2007). De plus, cette sonde a la propriété d'être liposoluble, elle permet donc de mesurer l'anion superoxyde extra et intracellulaire. Le radical nitroxyde produit (CM) est par ailleurs très stable et présente l'avantage de produire un signal en spectroscopie RPE (Figure 23).

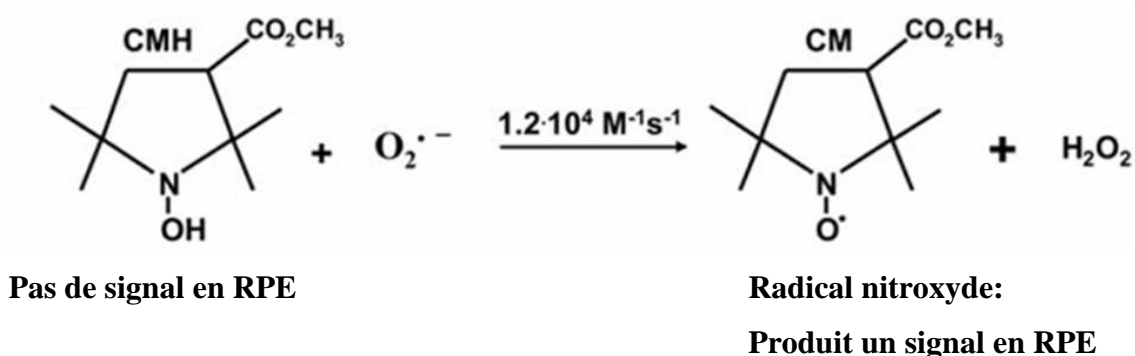


Figure 23 : Réaction spontanée entre la sonde CMH et l'anion superoxyde aboutissant à la production de radical nitroxyde (CM)

1.6.3. Mesure de l'anion superoxyde

L'oxydation du CMH par l'anion superoxyde étant le marqueur de la quantité d'anion superoxyde en présence, le CMH ne doit pas être oxydé par d'autres voies. Les expériences se déroulent donc en présence de deux antioxydants : la déféroxamine et le DETC. La

déferoxamine étant un chélateur de fer, elle va empêcher l'auto oxydation du CMH catalysée par les traces de métaux de transition présents dans la préparation. Quant au DETC, il s'agit d'un chélateur de cuivre, il va donc également empêcher l'auto oxydation du CMH mais va aussi inhiber la dégradation de l'O₂ par la Cu/Zn-SOD présente dans les tissus. Les 3 substances composant le mélange doivent être préparées dans la glace et les poudres doivent impérativement être dissoutes dans du Krebs-Hepes bullé à l'azote, gaz inerte qui va éliminer toute trace d'oxygène dans le Krebs-Hepes. Ces précautions doivent être prises pour éviter toute auto-oxydation du CMH. Les segments de poumons sont incubés dans le mélange contenant le CMH (500 µM, Noxygen), la déféroxamine (25 µM, Sigma) et le DETC (5 µM, Sigma) pendant 45 minutes à 37°C dans l'incubateur à 5 % de CO₂. A la fin de l'expérience, les segments de poumons sont congelés à l'azote liquide puis stockés à - 80°C jusqu'à la lecture au spectromètre.

1.6.4. Mesure du NO

Le fer et le DETC composant le piègeur de spin sont pesés et dissous séparément dans d'H₂O (fer) et le DS (DETC) bullé à l'azote placé dans la glace. Les deux composants sont mélangés précautionneusement et de façon extemporanée afin de former le colloïde Fe(DETC)₂. Les segments de poumons sont placés dans 750 µl de DS (auparavant filtré et bullé à l'azote), puis, 250 µl de piègeur de spin y sont ajoutés pendant 45 minutes à 37 °C dans l'incubateur à 5 % de CO₂. A la fin de l'expérience, les segments de poumons sont congelés dans l'azote liquide puis stockées à -80°C jusqu'à la lecture au spectromètre.

1.7. Etude de la fonction endothéliale : la réactivité vasculaire en chambre à organes isolés

Les études de la réactivité vasculaire sont réalisées sur des anneaux d'artère pulmonaire principale et d'artères mésentériques secondaires de rat pour la première étude, et sur des anneaux d'artère coronaire de porc sur la deuxième étude. Les anneaux sont montés entre deux mini-crochets eux-mêmes montés sur deux crochets, le premier étant fixe et le second relié à un capteur de tension lui-même relié à un amplificateur et à un ordinateur permettant la visualisation et l'enregistrement des variations de tension isométrique. Le tout est placé dans des cuves à organes isolés contenant 10 ml de solution de Krebs bicarbonate à 37 °C et oxygénée par un mélange de 95 % O₂ et 5 % de CO₂ (Figure 24). Les anneaux d'artère pulmonaire sont équilibrés au début de l'expérience contre une tension initiale de 1 g, et de 5 g pour les anneaux de coronaire de porc. Les anneaux sont contractés avec du chlorure de

potassium (KCl, 80 mM), permettant par une dépolarisation maximale de tester la réactivité du muscle lisse vasculaire. Après obtention de l'effet maximal, des lavages successifs sont effectués. Afin de vérifier la fonctionnalité de l'endothélium, les anneaux sont contractés à la phényléphrine (PE 10^{-6} M) ou avec le U46619 (un analogue du TXA_2) et au plateau de contraction, l'acétylcholine (ACh 10^{-6} M) ou la bradykinine (BK $3 \cdot 10^{-7}$ M) est ensuite ajoutée. Lorsque l'endothélium est présent et surtout fonctionnel, alors l'ACh ou la BK va induire une relaxation des anneaux.

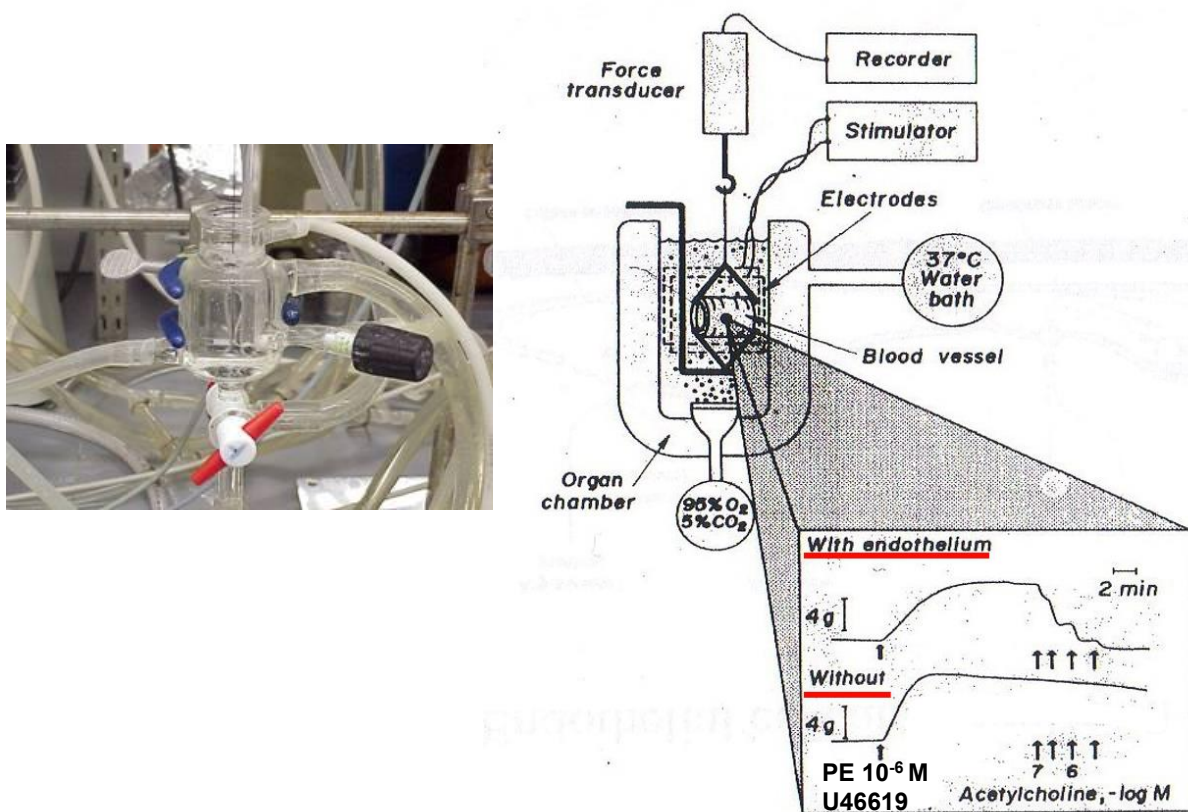


Figure 24 : Représentation et fonctionnement des chambres à organes isolés (Lüscher and Vanhoutte, CRC Press, 1990)

En revanche, lorsque pour les besoins expérimentaux, on enlève mécaniquement l'endothélium ou dans les cas pathologiques associées à une dysfonction endothéliale, cette relaxation sera partiellement ou totalement inhibée. Après des lavages et une période d'équilibration de 30 minutes, Différents modulateurs pharmacologiques sont ajoutés au Krebs afin d'étudier l'implication des différentes composantes de la relaxation.

- L'indométacine (10 μM), un inhibiteur des cyclooxygénases, afin d'exclure la production de prostanoïdes vasoactifs, notamment la PGI_2 : révélant la composante (NO + EDH (hyperpolarisation dépendante de l'endothélium) ;
- Une combinaison indométacine + N^{O} -nitro-L-arginine (L-NA, 300 μM), un inhibiteur de la NO synthase, révélant la composante EDH de la relaxation ;
- La combinaison indométacine + charybdotoxine (CTX, 0.1 μM) + apamine (APA, 0.1 μM), deux inhibiteurs des canaux potassiques calcium-dépendant de moyenne et de faible conductance (IK_{ca} , SK_{ca} , respectivement) révélant la composante NO de la relaxation ;
- Une condition contrôle ne contenant aucun inhibiteur.

Pour caractériser l'origine redox-sensible de la dysfonction endothéliale induite par les émulsions lipidiques, différents antioxydants sont utilisés avec un temps de pré-incubation de 30 minutes avant de contracter avec le U46619 :

- Le superoxyde dismutase (SOD, 500 UI) dismutant l'anion superoxyde ;
- Le MnTMPyP (manganese(III) tetrakis(1-méthyl-4-pyridyl)porphyrin pentachlorure, 100 μM) un analogue perméant membranaire du SOD permettant de mettre en évidence la présence d'anions superoxydes ;
- La Catalase (CAT, 500 UI) catalysant la dismutase de peroxyde d'hydrogène ;
- Le PEG-catalase (500 UI), un analogue perméant membranaire de la catalase, permettant de mettre en évidence la présence du peroxyde d'hydrogène.
- La N-acétylcystéine (NAC, 100 μM) un antioxydant non spécifique.

Après 30 minutes, les anneaux sont contractés avec la PE ou au U46619 avant de d'appliquer une gamme croissante et cumulative d'ACh (10^{-10} M - 10^{-5} M) ou bradykinine pour les artères coronaires de porc (BK 10^{-10} M - 10^{-6} M) afin de déterminer la capacité de relaxation des artères saines et pathologiques. Ensuite, une gamme de nitroprussiate de sodium (donneur exogène de NO, SNP 10^{-10} M - 10^{-5} M) a été réalisé sur des anneaux dépourvu d'endothélium de manière mécanique, afin de pouvoir tester l'intégrité du muscle lisse vasculaire.

1.7. Analyses Statistiques

Les résultats sont représentés en valeur moyenne +/- l'écart standard à la moyenne (SEM). La différence entre les moyennes est déterminée par une analyse de variance (ANOVA), suivi d'une comparaison post hoc en utilisant la méthode Bonferroni (version 5.04 for Windows, GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA). Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Article 1

La formulation EPA:DHA 6:1 prévient la dysfonction endothéliale, et le remodelage vasculaire et ventriculaire droit dans l'hypertension artérielle pulmonaire chez le rat.

The omega-3 EPA:DHA 6:1 superior formulation prevents the monocrotaline-induced pulmonary hypertension, endothelial dysfunction and vascular remodeling, and right ventricular failure in rats

Amissi Said, Zahid Rasul Niazi, Mélanie Burban, Romain Kessler, Mathieu Canuet, Florence Toti, Laurent Monassier, Nelly Boehm, Cyril Auger, Ferhat Meziani and Valérie B. Schini-Kerth

L'HTAP est une maladie rare, définie par une PAPm supérieure à 25 mmHg au repos. Elle est caractérisée par un remodelage des artéioles pulmonaires exacerbées par des infiltrats inflammatoires et le stress oxydant, aboutissant à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et à l'insuffisance ventriculaire droite. Les nouveaux traitements pharmacologiques ciblent la dysfonction endothéliale, caractérisée par une biodisponibilité réduite de la prostacycline et du monoxyde d'azote et à une surproduction de l'endothéline-1. Malgré les avancées récentes dans la prise en charge des patients atteints d'HTAP, la survie des patients n'a pas été réellement améliorée. Les traitements actuels ne permettent pas de guérir cette maladie grave. Il y a donc un fort besoin de nouvelles approches thérapeutiques sur la prise en charge des patients HTAP. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés aux oméga-3 connus dans la littérature pour leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé et en particulier la réduction de la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires, afin d'évaluer leurs potentiels à prévenir l'HTAP.

Nous avons émis l'hypothèse que le stress oxydant associé à l'inflammation jouerait un rôle déterminant dans la sévérité de la vasoconstriction et le remodelage anormale observée dans l'HTAP. L'injection de MCT induit chez des rats des lésions vasculaires pulmonaires, de la fibrose suivie d'un œdème pulmonaire de perméabilité et un remodelage des petites artères pulmonaires associées la prolifération et à l'inflammation vasculaire pulmonaire aboutissant à

une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et une insuffisance ventriculaire droite.

L'évaluation de l'HTAP induite par l'injection de MCT a nécessité la réalisation de :

- L'échocardiographie et le cathétérisme cardiaque pour déterminer les paramètres hémodynamiques (PAPm, RSVP, débit cardiaque), le remodelage artériel pulmonaire et du VD ;
- La détermination de l'hypertrophie du VD par la majoration de l'indice de *Fulton* correspondant au rapport du poids du VD sur la somme du poids VG + septum ;
- Les analyses histologiques pour quantifier le remodelage des artérioles pulmonaires et des cardiomyocytes du VD ;
- Les quantifications d'immunohistochimie et d'immunofluorescence pour évaluer l'effet du traitement sur les infiltrations de macrophages et de lymphocytes,
- L'évaluation du stress oxydatif au niveau des sections des poumons en utilisant la sonde fluorescente dihydroéthidium (DHE) et la caractérisation du stress oxydant par le niveau d'expression de NADPH oxydase, des cyclooxygénases, et de la eNOS, les récepteurs ET_A et ET_B de l'ET-1, et AT1R de l'angiotensine II ;
- La réactivité vasculaire de l'artère pulmonaire en réponse à l'acétylcholine et à la phényléphrine.

Les principaux résultats montrent que le traitement *per os* pendant 4 semaines des rats MCT avec l'EPA:DHA 6:1 prévient :

- L'élévation de la PAPm, la pression systolique du VD et la diminution du débit cardiaque ;
- La dilatation et l'hypertrophie du VD ainsi que les infiltrats de macrophages au niveau du VD
- L'augmentation des RVP, le remodelage artériolaire pulmonaire en empêchant complètement l'épaississement de la paroi des artérioles et les infiltrats de macrophages et de lymphocytes ;
- La production accrue des ROS et l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase (p22^{phox}, p47^{phox}), des cyclooxygénases et de la eNOS découplée ;
- La dysfonction endothéliale en améliorant la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine au niveau de l'artère pulmonaire principale.

The omega-3 EPA:DHA 6:1 formulation prevents the monocrotaline-induced pulmonary hypertension, endothelial dysfunction and vascular remodeling in rats

Amissi Said¹, Zahid Rasul Niazi¹, Mélanie Burban¹, Romain Kessler², Mathieu Canuet³, Florence Toti¹, Laurent Monassier⁴, Nelly Boehm⁵, Cristina Antal⁵, Cyril Auger¹, Ferhat Meziani² and Valérie B. Schini-Kerth¹

¹UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg ; ²EA 7293, Stress Vasculaire et Tissulaire en Transplantation ³Pneumologie-addictologie Clinique, 5101 Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg ; ⁴EA 7296, Laboratoire de Neurologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, ⁵Institut d'histologie, Fédération de médecine translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg.

Submitted in hypertension

*** Correspondence:**

Valérie B Schini-Kerth, PhD

UMR CNRS 7213, Faculty of Pharmacy

74, route du Rhin

67401 Illkirch, France

Phone: +33 3 68 85 41 27

Fax: +33 3 68 85 43 13

E-mail: valerie.schini-kerth@unistra.fr

Short title: The EPA:DHA 6:1 prevents the monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat

ABBREVIATIONS : Ach, acetylcholine; CO, cardiac output; COX, cyclooxygenase; DHA, docosahexaenoic acid; DHE, dihydroethidium; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EPA, eicosapentaenoic acid; ET-1, endothelin-1; ET_{A/B}, ET receptor A and B; MCT, monocrotaline; mPAP, mean pulmonary arterial pressure; PAAT, pulmonary artery acceleration time; PAH, pulmonary arterial hypertension; PHE, phenylephrine; PVR, pulmonary vascular resistance; ROS, reactive oxygen species; RVSP, right ventricular systolic pressure and VTI, velocity time integral.

ABSTRACT

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized elevated pulmonary arterial resistance leading to right heart failure. Pulmonary arterial proliferation and remodeling, endothelial dysfunction, inflammation and oxidative stress promote the development of pulmonary hypertension. Omega-3 polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA) have been shown to protect the cardiovascular system and reduce inflammation and oxidative stress. The possibility that EPA:DHA 6:1 a superior omega-3 formulation prevents pulmonary arterial and right ventricular remodeling and dysfunction was evaluated an experimental model PAH.

Methods: Male Wistar rats received 500 mg/kg/day of either EPA:DHA 6:1 or corn oil by daily gavage. After one week, PAH was induced by a single subcutaneous injection of monocrotaline (MCT, 60 mg/kg). After three weeks, cardiac function and morphology were assessed by echocardiography, vascular morphometry by histology, lymphocyte/macrophage infiltration by immunofluorescence, oxidative stress using dihydroethidium and EPR were determined in the pulmonary small artery wall, and pulmonary artery reactivity using organ chambers.

Results: MCT treatment was associated in the pulmonary artery with a significant increased mean pulmonary arterial pressure (mPAP), vascular resistance, and blunted endothelium-dependent relaxations to acetylcholine, in pulmonary arterioles with increased wall thickness and oxidative stress, and in the heart with increased RV systolic pressure (RVSP), RV hypertrophy and a reduced cardiac output (CO). Compared to the MCT group, the EPA:DHA 6:1 treatment prevented the MCT-induced changes in the morphology and pressure in the pulmonary artery and the RV, and also prevented the decreased CO. EPA:DHA 6:1 treatment also reduced the MCT-induced pulmonary artery endothelial dysfunction, and the level of oxidative stress in pulmonary arterioles. The MCT-induced vascular oxidative stress was significantly reduced by N-acetylcysteine, VAS-2870, N^G-nitro-L-arginine and indomethacin. The protective effect of EPA:DHA 6:1 was associated with the prevention of the MCT-induced upregulation of eNOS, angiotensin type 1 receptors, endothelin A and B receptors, COX-1 and COX-2, and the NADPH oxidase subunits (p22phox and p47phox) in pulmonary arterioles, and a reduced pulmonary infiltration of macrophages and lymphocytes.

Conclusion: The present findings indicate that the EPA:DHA 6:1 formulation has a vascular effect in PAH by preventing RV failure, pulmonary arterioles remodeling and dysfunction,

and inflammation in lungs, most likely by preventing the NADPH oxidase-, COX- and uncoupled eNOS-mediated vascular oxidative stress.

KEY WORDS: Omega-3 . pulmonary vascular remodeling . right ventricular hypertrophy . inflammation . oxidative stress

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is defined by a mean pulmonary arterial pressure (mPAP) ≥ 25 mmHg at rest (1). It is a chronic and progressive lung disease characterized by pronounced small pulmonary artery remodeling leading to chronic elevation of pulmonary vascular resistance and subsequent right ventricular failure (1-3). It is also characterized by an endothelial dysfunction involving decreased NO and thrombosis (4). Moreover, oxidative stress and inflammatory responses have been shown to play a critical role in both human and experimental PAH (5-7). Indeed, pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1 β and IL-6 and intense lung perivascular infiltrates of macrophages and lymphocytes are observed in human idiopathic PAH (8, 9) and monocrotaline (MCT)-induced PAH (5, 10). High levels of oxidative stress are observed in pulmonary vascular lesions of patients with severe PAH as a consequence of tissue hypoxia (11), ischemia (12) and possibly also involving of inflammatory response (13, 14).

Several studies have reported that long chain polyunsaturated omega-3 fatty acids including eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acids (DHA, 22:6n-3) have a beneficial effect on the cardiovascular system (15-17). Their potential protective effects include the antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative and the endothelial formation of NO, a vasoprotective factor (18-22). Indeed EPA:DHA 6:1 a superior omega-3 formulation caused pronounced endothelium-dependent relaxations of porcine coronary artery rings, and increased the endothelial formation of NO subsequent to the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway leading to the phosphorylation of eNOS at Ser 1177 (15, 22).

Therefore, the aim of the present study was to determine the ability of EPA:DHA 6:1 to prevent the development of PAH using MCT-induced PAH in rats. To test this hypothesis, we investigated the chronic efficacy of oral EPA:DHA 6:1 treatment in MCT-treated rats, and, if so to characterize the underlying mechanism. The MCT-induced PAH is a well-established experimental model of PAH causing similar morphologic damage as that observed in humans with idiopathic PAH (23, 24). The MCT-induced PAH is associated with endothelial cell injury followed by an inflammatory response and vascular oxidative stress (25, 26).

Materials and methods

Animals

Experiments were conducted according to the European Union regulations (Directive 86/609 EEC) for animal experiments, and complied with our institution's guidelines for animal care and handling. This study was approved by the Strasbourg Regional Committee of Ethics in Animal Experimentation and with the French law for the protection of animals.

The monocrotaline (MCT) model of pulmonary arterial hypertension

Adult male Wistar rats (150 to 200 g) were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and maintained in a temperature-controlled room with a 12:12 light-dark cycle. Rats were randomly divided into 4 groups: control (n = 7), EPA:DHA 6:1 (n = 7), MCT (n = 13) and MCT + EPA:DHA 6:1 (n = 13). Rats received daily by oral intake gavage 500 mg/kg/d of either EPA:DHA 6:1 (Pivotal Therapeutics, Inc Wood-bridge, ON, Canada) or corn oil as control. One week after the beginning of gavage, rats received a single subcutaneous injection of either an isotonic saline solution (control groups) or MCT (60 mg.kg⁻¹). The pyrrolizidine toxic alkaloid MCT (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was dissolved in 1 N HCl and neutralized to pH 7.4 with 1 N NaOH. Thereafter, the oral intake of either corn-oil or EPA:DHA 6:1 was continued for 3 weeks. Body weight was measured weekly to adjust the dose accordingly.

Echocardiographic and hemodynamic studies

Three weeks after MCT-injection, transthoracic two-dimensional, M-mode, and Doppler pulse wave images were obtained in rats anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg ip) to evaluate the progression of PAH. Both long- and short-axis views at the papillary muscle level and apical-4 chamber views were done with a Sonos 5500 (Philips, USA) equipped with 12-MHz sectorial transducer.

M-mode measurements

Pulmonary artery diameter is obtained in the parasternal long-axis. The left ventricular (LV) and right ventricular (RV) end-diastolic and end-systolic diameters were measured in the parasternal short axis view. The fractional area change (FAC) for the RV was measured at the apical 4-chamber view and calculated as [(end-diastolic - end-systolic area)/end-diastolic area] (27). Cardiac output and stroke volume were obtained from the B-mode long axis according to Simpson's method (28).

Doppler imaging

Pulse-wave Doppler of pulmonary outflow was recorded in the parasternal long-axis view at pulmonary valve leaflets. In addition, to characterize the pulmonary outflow Doppler envelope, the pulmonary artery acceleration time (PAAT) and the velocity time integral (VTI) were measured. The VTI was obtained by tracing the outer edge of the pulmonary outflow Doppler profile. PAAT was measured from the time of onset of systolic flow to peak pulmonary outflow velocity. The tricuspid valve was used to determine the tricuspid regurgitation velocity (TR) with color flow and pulsed-wave Doppler in the apical 4-chamber view so that the tricuspid and mitral valves could be clearly visualized. If TR was observed, the transducer was aligned to achieve the maximal peak velocity. The RV systolic pressure was calculated using the peak TR velocity (V_{max}) in the modified Bernoulli ($RVSP = 4 \times V_{max}^2$) (29, 30). The pulmonary vascular resistance was calculated as $[PVR = V_{max} \text{ (m/s)}/VTI \text{ (cm)}]$ of flow wave of pulmonary artery. Right atrial area from the 4-chamber apical view and the inferior vena cava diameter and collapsibility were measured. All measurements and calculated indexes are presented as the average of three cardiac cycles.

Hemodynamic measurements and tissue preparation

Following echocardiography, the mean pulmonary arterial pressure (mPAP) was monitored with a heparinized saline catheter inserted into the RV through the jugular vein and placed in the lumen of the pulmonary artery. The systemic arterial blood pressure was monitored with a pressure catheter inserted into the femoral artery, and steady-state hemodynamic was recorded using a blood pressure transducer (EMKA Technologie, Paris, France). Subsequent to hemodynamic measurements, rats were euthanized and the hearts and lungs were isolated, the left lungs lobe and some group of hearts were in fixated in 4% paraformaldehyde for 48 h for morphology study. The RV and right lungs were embedded in Tissue-Tek[®] O.C.T. and snap-frozen on liquid nitrogen and quantitative as immunofluorescence and Western blot analysis.

Assessment of right ventricular hypertrophy and remodeling

Subsequent to hemodynamic measurements, rats were euthanized and the hearts were isolated to separate the right ventricle (RV) wall from the left ventricle wall and the septum (LV + S) and then weighed. The RV hypertrophy was assessed by the weight ratio of RV to LV plus the septum $[RV/LV + S]$ as a Fulton's index (Mam et al. 2010). Cardiomyocytes cross-sectional area and interstitial collagen content were determined in the RV and LV to

determine cardiac ventricle tissue remodeling. Four μm sections of heart were stained with hematoxylin and eosin (H-E) or Gomori's trichrome to assess fibrosis. 50 cardiomyocytes in each ventricle per rat were determined on transversely cut myocardial.

Assessment of pulmonary arteriolar wall thickness

The left lung lobe from each rat was isolated, harvested and perfused via the trachea with a 4% paraformaldehyde solution, and then immersed in the fixative solution for 48 h. Following dehydration, lungs were embedded in paraffin blocks and cut into 4 μm thick sections. Lungs sections were stained with H-E for morphology analysis (Olympus camera and microscope). The images of terminal arterioles were captured with magnification 20X and measured using ImageJ Software. Pulmonary vascular remodeling was evaluated by determining the percentage wall thickness (%WT) in H-E stained sections and wall areas were measured in smooth muscle α -actin-stained sections (% WA). A minimum of 16 arterioles of comparable size ($< 50 \mu\text{m}$) per lung sections were examined for each group. The percent WT of pulmonary arterioles was calculated as follows: $\% \text{ WT} = [(2 \times \text{medial thickness}/\text{external diameter}) \times 100]$ and the percent wall area, $\% \text{ WA} = [(\text{vessel wall area}/\text{vessel lumen ratio}) \times 100]$.

Immunohistochemistry

The antibodies against smooth muscle α -actin (mouse monoclonal, 1:20000; Santa Cruz) to assess the degree of muscularization of small peripheral pulmonary arterioles, CD68 (mouse monoclonal [ED1], 1:1000; Abcam) for macrophages and CD3 (rabbit monoclonal [SP7], 1:100; Abcam) for lymphocytes staining were used for this study. Microwave antigen retrieval (10 mM citrate buffer, pH 6.0) of 4 μm paraffin sections was followed by incubation in blocking buffer. Endogeneous peroxidases were blocked (3% H_2O_2 for 10 min) before incubation with a primary antibody overnight at 4°C. Thereafter, sections were incubated with a secondary biotinylated antibody for 2h, and then streptavidin-biotin-peroxidase complex linked to HRP (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, AbCys, Paris, France) for 30 min. VIP peroxidase substrate kit (Vector Laboratories) was used as chromogen. Sections were counterstained with methyl green, air-dried and cover slipped with Eukitt (Labonord, Templemars, France). Ten photographs were taken from each lung sample, and the fraction area occupied by the macrophages and the number of lymphocytes was evaluated from each photograph using the ImageJ software (National Institutes of Health, <http://rsweb.nih.gov/ij/>).

Immunofluorescence studies

Right lung lobes were embedded in Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France), frozen in liquid nitrogen bath and cryosectioned at 14 µm. Lung sections were first fixed with 4% paraformaldehyde, washed and treated with 5% bovine serum albumin in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 1 h at room temperature to block non-specific binding. Lung sections were then incubated overnight at 4°C with an antibody directed against either eNOS (mouse monoclonal, 1/1000, Santa Cruz), angiotensin II type 1 receptor (rabbit polyclonal AT-1, 1/500; Santa Cruz), endothelin-1 type A and B receptors (rabbit polyclonal ET_A, ET_B, 1/1000; Abcam), cyclooxygenase (rabbit monoclonal COX-1 and COX-2, 1/1000, Abcam) or the NADPH oxidase subunits (p22^{phox} and p47^{phox}, 1/500, Santa Cruz). Sections were then washed with PBS, incubated with the secondary antibody (1/400, immunoglobulin G coupled to Alexa 488- or 633) for 2h at room temperature in the dark before being washed with PBS and mounted in Dako fluorescence mounting medium (Dako France SAS, Les Ulis, France) and cover-slipped. All samples for immunofluorescence studies were observed using a confocal laser-scanning microscope (Leica SP2 UV DM IRBE; Leica, Heidelberg, Germany) with a 20X magnification lens. Quantification of fluorescence levels was performed using the ImageJ software.

Determination of vascular oxidative stress

The redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE, 2.5 µM) was applied onto 25 µm unfixed lung cryosections for 30 min at 37°C in a light protected humidified chamber to determine the *in situ* formation of ROS. To characterize the source of ROS, sections were incubated with either N-acetylcysteine (NAC, antioxidant 1 mM), VAS-2870 (VAS, NADPH oxidase inhibitor, 10 µM), N-nitro-L-arginine (L-NA, NO synthase inhibitor, 300 µM), indomethacin (Indo, cyclooxygenase inhibitor, 10 µM), or MRK (inhibitors of the mitochondrial respiration chain (myxothiazol, 0.5 µM + rotenone, 1 µM + potassium cyanide (KCN), 1 µM) for 30 min at 37°C before DHE staining. Sections were then washed three times, mounted in DAKO and cover-slipped. The level of fluorescence in each section was examined under a confocal laser-scanning microscope (Leica SP2 UV DM IRBE; Leica, Heidelberg, Germany) with a 20X magnification lens. Quantification of fluorescence levels was performed using the ImageJ software.

Evaluation of O₂⁻ and NO levels

The levels of NO and O₂⁻ in lungs was determined by electron paramagnetic resonance (EPR) in frozen tissues at liquid nitrogen temperature.

Nitric oxide (NO) determination

Lung samples were incubated for 30 min in Krebs-Hepes buffer containing bovine serum albumin (20.5 g/L), CaCl₂ (3 mM), and L-arginine (0.8 mM). NaDETC (3.6 mg) (DETC: diethyldithiocarbamate) and FeSO₄·7H₂O (2.55 mg) were separately dissolved under nitrogen gas bubbling in 10-mL volumes of ice-cold Krebs-Hepes buffer. These compounds were rapidly mixed to obtain a pale yellow-brown opalescent colloid Fe(DETC)₂ solution (0.4 mM), which was used immediately. The colloid Fe(DETC)₂ solution was added to the incubation solution of lungs for 45 min at 37°C. The level of NO was determined using a table-top x-band spectrometer Miniscope (Magnettech, MS200, Berlin, Germany). The quantification of the signal is based on the mean of the height (amplitude) of the three signals. Values are expressed in signal amplitude (amplitude, arbitrary units).

Superoxide anion (O₂⁻)

Lung samples were allowed to equilibrate in deferoxamine-chelated Krebs-Hepes solution containing 1 hydroxy-3 methoxycarbonyl 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen, Germany, 500 μM), deferoxamine (25 μM), and DETC (5 μM) under constant temperature (37°C) for 1 h. The reaction was stopped by freezing the samples in liquid nitrogen before EPR spectroscopy analysis. Values were expressed as arbitrary units per milligram weight of dried tissue (A/Wd).

Vascular reactivity studies

Vascular reactivity studies are performed in main pulmonary artery and secondary mesenteric artery rings. Briefly, the arteries were excised, carefully cleaned of connective tissue in Krebs bicarbonate solution and cut into rings (3 mm length). Rings were suspended in organ chambers containing oxygenated (95% O₂; 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution (mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 25, and D-glucose 11, pH 7.4 at 37°C) for the determination of changes in isometric tension. After an equilibration period, rings were subjected to functional test before construction of either a concentration-contraction curve to phenylephrine, or a concentration-relaxation curve to acetylcholine on rings precontracted with phenylephrine (10 μM). The concentration-response curves were constructed both in absence or presence of an eNOS inhibitor (L-NA, 300 μM) to assess the role of the basal endothelial NO formation.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean ± SEM of n different rats. Statistical analysis was performed using either a one-way or a two-way analysis of variance test (ANOVA), followed by Bonferroni's post-hoc test as appropriate using GraphPad Prism software (version 5.04 for Windows, GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA). A *P* value < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

EPA:DHA 6:1 prevents the MCT-induced increase in mPAP and RVSP

Three weeks after MCT injection, hemodynamic parameters were monitored by echocardiography and right ventricular catheterization. MCT-treated rats consistently developed pulmonary hypertension associated with a significant increase in mPAP from 16 ± 0.3 to 35.2 ± 0.7 mmHg and RVSP from 17.4 ± 0.5 to 40.5 ± 1.9 mmHg (Fig. 1A, B). In addition, CO was significantly decreased in the MCT group compared with the control group (124 ± 7.4 to 67.7 ± 3.7 ml/min) (Figure 1C). Oral intake of EPA:DHA 6:1 significantly reduced mPAP to 29.6 ± 0.8 mmHg and RVSP to 31.9 ± 0.8 mmHg and also improved CO to 90.2 ± 4.4 mL/min (Fig. 1A, C).

The heart rate was slightly but significantly lowered from 392.7 ± 8.1 bpm to 333.2 ± 4.9 bpm by the MCT treatment and the mean systemic arterial pressure is not significantly different in the four groups (Fig. 1D, E).

EPA:DHA 6:1 prevents the MCT-induced RV remodeling and hypertrophy

RV morphology and function were evaluated by echocardiography. The MCT group presented a significant dilatation of the RV indicated by the increased RV area, end-diastolic and systolic diameters compared to the control group. The dilatation of the RV was associated with a decreased of the RV fractional area change (RVFAC %) (control vs MCT: 42.4 ± 1.6 vs 27.6 ± 3.1). Oral intake of EPA:DHA 6:1 prevented RV remodeling by improving RV morphology and function (Fig. 2A-D).

Right ventricular hypertrophy was assessed by the weight ratio of RV/(LV+S). The MCT group developed severe RV hypertrophy manifested by an RV/(LV+S) ratio of 0.54 ± 0.03 compared with 0.22 ± 0.01 in the control group (Fig. 2E). Similarly, the ratio of RV weight to body weight was significantly higher in the MCT-treated group compared to the control group. The marked MCT-induced RV hypertrophy was reduced significantly to 0.33 ± 0.01 by the EPA:DHA 6:1 treatment indicating that chronic oral intake of EPA:DHA 6:1 was able to prevent PAH-induced RV hypertrophy.

EPA:DHA 6:1 prevents the MCT-induced RV cardiomyocytes hypertrophy and macrophages infiltration

In the RV, representative H-E staining showed that the MCT treatment induced a significant cardiomyocytes hypertrophy as compared to the control group (Figure 3A). The RV cardiomyocytes hypertrophy was associated with enhanced perivascular infiltration of macrophages detected by anti-CD68 staining (Figure 3B). The EPA:DHA 6:1 treatment prevented the MCT-induced RV cardiomyocytes hypertrophy by restored RV area and reduced infiltration of macrophages (Fig. 3A, B). In contrast, in the left ventricle, cardiomyocytes size was similar in all group studied, and only a low level of infiltration of macrophages was observed.

EPA:DHA 6:1 prevents MCT-induced pulmonary arterial remodeling

Pulmonary vascular remodeling was assessed by pulse-wave Doppler of pulmonary outflow. MCT significantly increased the pulmonary artery diameter and pulmonary vascular resistance (control vs. MCT: 0.37 ± 0.03 vs. 0.84 ± 0.05 unite wood), indicating hypertrophy and stiffness of the pulmonary artery, and reduced the velocity-time integral (VTI) and pulmonary artery acceleration time (43.05 ± 2.39 vs. 26.06 ± 0.91 ms), indicating an increased pulmonary arterial pressure. EPA:DHA 6:1 treatment significantly prevented the MCT-induced changes on pulmonary artery diameter, PVR, PAAT, and pulsatility (Fig. 4). Indeed, to examine the level of pulmonary vascular remodeling, morphometric analysis was performed on lung tissue sections stained with H-E or α -actin. Quantitative morphometric analyses showed pulmonary arterioles remodeling in MCT group (Figure 5). The medial thickness of pulmonary arterial was markedly increased in arterioles with external diameter $< 50 \mu\text{m}$ in the MCT group (control vs. MCT: 25.9 ± 0.6 vs. 73.7 ± 0.5). The medial wall hypertrophy was accompanied with muscularization of small pulmonary arteries evidenced by enhanced α -actin staining (Fig. 5). The EPA:DHA 6:1 treatment significantly attenuated the MCT-induced increase in wall thickness and pulmonary arterioles muscularization. In addition, an increased collagen deposition in MCT group as assessed by Gomori's Trichrome, which was prevented by the EPA:DHA 6:1 treatment (Fig. 5).

To determine the perivascular inflammatory cell infiltration, immunohistochemical staining was performed in lung sections with CD68 for macrophages and CD3 for T lymphocytes. The MCT-treatment was associated with a significantly macrophages and lymphocytes infiltration

surrounding pulmonary remodeled arterioles. The EPA:DHA 6:1 treatment significantly prevented the MCT induced infiltration of macrophages and lymphocytes (Fig. 5B).

EPA:DHA 6:1 treatment prevents MCT-induced vascular oxidative stress involving several sources in pulmonary arterioles

Reactive oxygen species (ROS) have been proposed as a pathogenic mechanism underlying the vascular remodeling observed in MCT-induced PAH (5). The pulmonary vascular level of oxidative stress was assessed using the redox-sensitive fluorescent probe DHE. The MCT treatment increased the formation of ROS as indicated by the markedly increased the DHE fluorescence signal throughout the medial wall in comparison to the control group. These effects were significantly prevented by EPA:DHA 6:1 treatment (Figure 6A). In order to determine the source of ROS, lung sections were treated with different inhibitors major vascular sources of ROS. The MCT-induced formation of ROS in the pulmonary arterioles wall was significantly inhibited by N-acetylcysteine (NAC, antioxidant), VAS-2870 (an NADPH oxidase inhibitor and antioxidant), L-NA (an eNOS inhibitor), indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) and by a combination of inhibitors of the mitochondrial respiration chain (MRK: myxothiazol, rotenone and KCN) suggesting the involvement of NADPH oxidase, COXs, uncoupled eNOS and the mitochondrial respiration chain (Fig. 6B). The levels of NO^- and O_2^- in lungs was determined by electron paramagnetic resonance (EPR) in frozen tissues at liquid nitrogen temperature. The MCT treatment increased NO^- and O_2^- production in lungs. EPA:DHA treatment significantly prevented the increased of NO^- and O_2^- production (Fig. 6 C, D).

To obtain further evidence for a role of eNOS, NADPH oxidase and COXs. Their expression level was determined by immunofluorescence staining in the pulmonary arterioles. A significantly increased immunofluorescence signal of the NADPH oxidase subunits p22^{phox}, p47^{phox}, and of COX-1 and COX-2 was observed in pulmonary arterioles of the MCT group compared to the control group (Fig. 7). The EPA:DHA 6:1 treatment significantly reduced the MCT-induced stimulatory effect for p22^{phox}, p47^{phox}, COX-2 and COX-1 (Figure 7A). In addition, an upregulation of eNOS was observed in the MCT group which was prevented by the EPA:DHA 6:1 treatment (Fig. 7).

EPA :DHA 6 :1 prevents the expression of endothelin-1 receptors (ET_A, ET_B) and angiotensin II receptor on pulmonary arterioles wall.

It has been suggested that PAH is associated with the increased expression of endothelin-1 (31) and angiotensin II (32) may contribute to the arterioles remodeling. An increased immunofluorescence level of endothelin-1 receptors (ET_A, ET_B) and angiotensin II receptor (AT1) throughout the pulmonary arterioles wall was observed in the MCT group (Fig 7). The EPA:DHA 6:1 treatment prevents MCT-induced changes of ET_A, ET_B and AT1 expression in pulmonary arterioles (Fig. 7).

EPA:DHA 6:1 prevents MCT-induced endothelial dysfunction in the pulmonary artery

Vascular reactivity was performed in primary pulmonary artery rings to evaluate the endothelial function using organ chambers. The MCT treatment significantly reduced the contractile responses to phenylephrine, and also the acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation of pulmonary artery rings pre-contracted with phenylephrine. The concentration-response curves were constructed both in absence or presence of an eNOS inhibitor (L-NA) to assess the role of the basal endothelial NO formation. The MCT treatment increased basal nitric oxide (NO) production. The EPA:DHA 6:1 prevented MCT-induced endothelial dysfunction as indicated by the increased relaxation to Ach (Fig. 8).

DISCUSSION

The present study demonstrated that the optimized EPA:DHA 6:1 formulation prevents the development of PAH in MCT-treated rat. Since, rats were treated with EPA:DHA 6:1 one week before the induction of PAH, the findings indicate the capacity of the omega-3 products to prevent the disease and not to cure it. The MCT-induced PAH rat model has been widely used as an experimental model of PAH (33) and it is tough to the most similar animal model to the human form of the disease (34). It is characterized by pulmonary endothelial cell damage, associated with an inflammatory response and vascular oxidative stress. It also leads to small pulmonary arterial and RV remodeling and dysfunction (35, 36). Previous studies focused on the effects of omega-3 on the systemic circulation but provided little information on its pulmonary effects.

The presents findings indicate that daily oral treatment with EPA:DHA 6:1 significantly prevented an elevation of mean pulmonary arterial pressure, RV systolic pressure and improved cardiac output in rats model of MCT-induced PAH. EPA:DHA 6:1 treatment also prevented pulmonary arterioles remodeling and dysfunction, RV hypertrophy and dilation, attenuated oxidative stress and inhibited inflammation. Our studies show that EPA:DHA 6:1 exerts anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative effects in the pulmonary arteries, which may contribute to prevent pulmonary hypertension. Recent study showed that DHA therapy reduced mPAP in a rat model of hypoxia-induced PAH and this effect was linked with inhibition of pulmonary vascular remodeling (37).

Echocardiography is widely used in the evaluation of PAH in the rat MCT model (38). The echocardiography analysis of control and MCT groups indicates that oral treatment of EPA:DHA 6:1 prevented in the pulmonary arteries of the MCT-treated rats the elevation of vascular resistance and the reduction of pulmonary acceleration time compared to control rats, suggesting that this formulation has the beneficial effect of reducing the stiffness of the pulmonary artery. In addition, oral treatment with EPA:DHA 6:1 significantly prevented the MCT-induced RV dilatation as indicated by increased RV area and decreased RV fractional area change (RVFAC), suggesting a beneficial effect of EPA:DHA 6:1 to reduce RVSP. The FAC is an ideal echocardiography parameter reflecting RV dysfunction and disease severity in PAH (39). Oral treatment with EPA:DHA 6:1 prevent RV hypertrophy characterized by increased RV/(LV + S) ratio, cardiomyocytes hypertrophy and extracellular matrix changes with fibrosis.

Previous studies have been revealed that inflammation plays a key role in human PAH as well as in experimental models including MCT-induced PAH (7, 40) . In response to injury and stress, a pronounced lung vascular inflammatory response is observed including macrophages, monocytes, lymphocytes and mast cells (41, 42) and they have been involved in the initiation of pulmonary vascular remodeling by matrix remodeling, collagen deposition, and vascular cell proliferation and migration in PAH (43, 44). These processes lead to increased pulmonary resistance and right heart failure. Consistent with these previous findings, a substantial increased number of CD68 (ED-1) and CD3⁺ positive cells were observed in the lungs of MCT-treated rats. In addition, an increased pulmonary arterial medial thickness and RV cardiomyocytes hypertrophy were observed and associated with an increased number of macrophages in perivascular intra-alveolar spaces, and of lymphocytes around the pulmonary arteries in the MCT-treated rats relative to the control group. Importantly, oral intake of EPA:DHA 6:1 significantly prevented the stimulatory effect of MCT on macrophages and T lymphocytes infiltration in the lung and right ventricle. Thus, these findings suggest that the EPA:DHA 6:1 formulation prevented MCT-induced PHA by reducing the inflammatory responses.

In addition to the inflammatory response, oxidative stress has been implicated in the pathogenic mechanism underlying the vascular remodeling and heart failure observed in pulmonary hypertension (14, 32, 45). Dysregulation of the pro-oxidant/antioxidant balance contributes to impair vascular tone and the pathological activation of anti-apoptotic and mitogenic pathways, leading to cell proliferation and obliteration of the vasculature (46). There is solid evidence in MCT-treated rats, that oxidative injury to the pulmonary vascular endothelium precedes pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation and medial hypertrophy in the distal pulmonary vascular bed and the rise in pulmonary artery pressure. Small pulmonary arterioles and RV remodeling is associated with an increased inflammatory infiltrate and oxidative stress as indicated by high levels of ROS formation throughout the pulmonary arterioles wall of MCT-treated rats. The characterization of the cellular sources of ROS in the small pulmonary arterioles indicated the involvement of several sources including NADPH oxidase, uncoupled eNOS, cyclooxygenase (COXs) and the mitochondrial respiration chain. Moreover, an up-regulation of several pro-oxidant enzymes including NADPH oxidase subunits p22^{phox} and p47^{phox}, COX-1, and COX-2 is observed in the small pulmonary arteries of MCT-treated rats. Oral intake treatment of EPA:DHA 6:1 substantially attenuated the level of vascular oxidative stress and remodeling by reducing in arterioles as

well as the upregulation of the NADPH oxidase subunits p22^{phox} and p47^{phox}, COX-1 and 2 and eNOS expression in MCT-treated rat. Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown that ROS promote cardiomyocyte hypertrophy as well as fibrosis (47) and also right ventricular failure in the MCT-induced PAH, (48). EPA:DHA 6:1 due to its antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective properties, improved right ventricular function as indicated by an increased CO and with inhibition of cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis.

Endothelial dysfunction has been shown to play a key role in the development of PAH and results in a decrease of vasodilator and antiproliferative factors (prostacyclin, nitric oxide) and in an increase in vasoconstrictor and proliferative factors (ET-1) (49). Moreover, inflammation and oxidative stress have been shown to contribute to the MCT-induced endothelial dysfunction most likely by reducing the bioavailability of NO and oxidizing tetrahydrobiopterin, an essential cofactor for eNOS (5, 10). Although decreased endothelium-dependent relaxation was observed in the pulmonary artery (50). The present findings indicated that MCT-induced pulmonary hypertension is associated with an endothelial dysfunction in main pulmonary artery without any effect on systemic vascular functions. The MCT treatment significantly reduced the contractile response of pulmonary artery rings to α -adrenergic agonist PHE. Blockade of NO production by L-NA enhanced PHE potency in MCT-treated rats. In addition, ACh-induced endothelium-dependent relaxation was reduced in pulmonary arteries of MCT treated-rats. Although the reduced ACh relaxation in the PH rats could be due to increased oxidative stress and decreased NO bioavailability in MCT treated-rats. The decreased bioavailability of NO reduces the antiproliferative effects of NO and thus contributes to the increased of pulmonary vascular remodeling and resistance. Previous studies have shown in isolated pulmonary arteries a reduced responsiveness to endothelium-dependent vasodilators including ACh and A23187, whereas others have suggested an increased basal NO production in the MCT-treated rats from (51, 52). We have showed that inflammation and oxidative stress of the lung in PAH stimulates the eNOS uncoupled. Oral intake of EPA:DHA 6:1 prevented the MCT-induced the development of PAH, reversed vascular remodeling, reduced vascular inflammation and improved the endothelial function, as indicated by an improvement ACh-induced relaxation. Thus, it could be hypothesized that EPA:DHA 6:1-induced elevation of cGMP. It is possible that up-regulation of eNOS contributes to the therapeutic action of omega-3. Furthermore, EPA:DHA 6:1 has been shown to stimulate the endothelial release of NO and to improve endothelial function subsequent to phosphorylation of PI3K/Akt/eNOS signaling pathway (22).

The endothelin (ET) system is activated in human pulmonary hypertension (PH) of various pathogenesises (53, 54). ET-1 could contribute to the development of human PH through its strong vasoconstrictive and promitogenic properties (55). Previous studies have shown enhanced ET-1-induced pulmonary vasoconstriction and vascular resistance in the MCT-PAH (56) and increased vasomotor tone in hypoxic PAH (5, 32). The present findings support a role for the ET-1 in the MCT-induced endothelial dysfunction. Indeed, an increased expression of ET_A and ET_B receptors was observed throughout the arterial wall of the MCT treatment group. The ET_A receptors are located on smooth muscle cells, where they mediate vasoconstrictive and proliferative effects (57). The ET_B receptor is the only subtype found predominantly on the vascular endothelium, where it promotes vasodilation through the release of nitric oxide and prostacyclin (31). There is also evidence that the ET_B receptor indirectly modulates ET-1 synthesis through negative feedback under the action of nitric oxide (53). They are also consistent with the fact that chronic bosentan, a non-selective ET-1 receptor antagonist reduced pulmonary hypertension in MCT-treated rats and prevented the MCT-induced endothelial dysfunction and oxidative stress (31, 58). Our data show that EPA:DHA 6:1 prevented the MCT-induced upregulation of the expression ET_A and ET_B receptors in MCT-induced PAH rats.

However, the mechanism explaining best the beneficial effect of omega-3 treatment to prevent pulmonary hypertension most likely includes its antioxidant, anti-inflammatory and endothelial protective properties. Two previous studies have demonstrated potential benefits of oral administration of MAG-DPA to reduce inflammation (decreased NF-kB and p38 MAPK activation) and proliferation (reduction in MMP-2, MMP-9 and VEGF expression levels in lung tissue homogenates) of pulmonary artery smooth muscle cells in MCT-treated rats (59) and DHA to inhibit the development of hypoxic pulmonary hypertension *in vitro* and *in vivo* studies (60). The effects of EPA and DHA have not be investigated in PAH; however, these two fatty acids affect cell function differently (61, 62).

Moreover, the beneficial role of omega-3 in cardiovascular health is supported by its metabolism. Indeed, omega-3, unlike omega-6, decreases the production of pro-inflammatory cytokines and leukocyte reactive oxygen species, increase the synthesis of anti-inflammatory cytokines, lead to the release of resolvins and modulate the activation of genes involved in the inflammatory process (63, 64). Furthermore, when administrated per os, omega-3 represents a stable compound that could serve as a precursor to generate resolvins and protectins molecules, which are known for their anti-inflammatory properties (65, 66).

Study limitation

This study indicates the potential of the EPA:DHA 6:1 to prevent MCT-induced PAH, in which inflammatory and oxidative stress related to pulmonary vascular endothelial dysfunction and remodeling. A subsequent study will be necessary to determine the efficacy of omega-3 in the treatment of an established PAH.

CONCLUSION

The present findings indicate that EPA:DHA 6:1 exerts a significant anti-oxidant, anti-inflammatory and endothelial protective effect in the vascular pulmonary and prevents the progression of pulmonary hypertension in MCT-treated rats by reducing pulmonary vascular remodeling, endothelial dysfunction, right ventricular hypertrophy and failure. The beneficial effects were associated with a reduced vascular inflammatory responses and oxidative stress mostly by preventing overexpression of NADPH oxidases, COXs and also of uncoupled eNOS. Further investigations are necessary to better assess the biological effects, elucidate the underlying mechanisms and to evaluate the potential of the omega-3 in the clinical trials. Future studies should determine whether EPA:DHA 6:1 treatment can reverse or delay the progression of established pulmonary hypertension, whether EPA:DHA 6:1 may potentiate the effects of current therapies and whether EPA:DHA 6:1 can exert direct cardioprotective effects preventing right ventricular failure in patients with pulmonary hypertension.

Conflict interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors' contributions

AS performed most of the experiments and analyzed data and wrote the manuscript. NZ and MB performed some experiments. AS, CA and VSK performed contributed to the discussion and wrote. RK, LM, NB and VSK designed the experiments and edited the manuscript.

References

1. Galiè, N., Hoeper, M. M., Humbert, M., Torbicki, A., Vachiery, J.-L., Barbera, J. A., Beghetti, M., Corris, P., Gaine, S., and Gibbs, J. S. (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European heart journal* **30**, 2493-2537
2. Humbert, M., Yaici, A., Sztrymf, B., and Montani, D. (2004) Pulmonary hypertension: from genetics to treatments. *Revue de pneumologie clinique* **60**, 196-201
3. Stenmark, K. R., Fagan, K. A., and Frid, M. G. (2006) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling cellular and molecular mechanisms. *Circulation research* **99**, 675-691
4. Humbert, M., Montani, D., Perros, F., Dorfmuller, P., Adnot, S., and Eddahibi, S. (2008) Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* **49**, 113-118
5. Crosswhite, P., and Sun, Z. (2010) Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Journal of hypertension* **28**, 201-212
6. Li, H., Lu, W., Cai, W. W., Wang, P. J., Zhang, N., Yu, C. P., Wang, D. L., Liu, B. C., and Sun, W. (2014) Telmisartan attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery endothelial dysfunction through a PPAR gamma-dependent PI3K/Akt/eNOS pathway. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **28**, 17-24
7. Price, L. C., Wort, S. J., Perros, F., Dorfmuller, P., Huertas, A., Montani, D., Cohen-Kaminsky, S., and Humbert, M. (2012) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* **141**, 210-221
8. Humbert, M., Monti, G., Brenot, F., Sitbon, O., Portier, A., Grangeot-Keros, L., Duroux, P., Galanaud, P., Simonneau, G., and Emilie, D. (1995) Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **151**, 1628-1631
9. Montani, D., Humbert, M., and Souza, R. (2011) Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **123**, e614
10. Chaumais, M. C., Ranchoux, B., Montani, D., Dorfmuller, P., Tu, L., Lecerf, F., Raymond, N., Guignabert, C., Price, L., Simonneau, G., Cohen-Kaminsky, S., Humbert, M., and Perros, F. (2014) N-acetylcysteine improves established monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respiratory research* **15**, 65
11. Hoshikawa, Y., Ono, S., Suzuki, S., Tanita, T., Chida, M., Song, C., Noda, M., Tabata, T., Voelkel, N. F., and Fujimura, S. (2001) Generation of oxidative stress contributes

- to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) **90**, 1299-1306
12. Al-Mehdi, A. B., Zhao, G., Dodia, C., Tozawa, K., Costa, K., Muzykantov, V., Ross, C., Blecha, F., Dinauer, M., and Fisher, A. B. (1998) Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circulation research* **83**, 730-737
 13. Demarco, V. G., Whaley-Connell, A. T., Sowers, J. R., Habibi, J., and Dellsperger, K. C. (2010) Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol* **2**, 316-324
 14. Bowers, R., Cool, C., Murphy, R. C., Tuder, R. M., Hopken, M. W., Flores, S. C., and Voelkel, N. F. (2004) Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **169**, 764-769
 15. Shimokawa, H., Aarhus, L. L., and Vanhoutte, P. M. (1988) Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids augment endothelium-dependent relaxation to bradykinin in coronary microvessels of the pig. *British journal of pharmacology* **95**, 1191-1196
 16. Auger, C., Said, A., Nguyen, P. N., Chabert, P., Idris-Khodja, N., and Schini-Kerth, V. B. (2016) Potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health. *Journal of cardiovascular pharmacology* doi: 10.1097/FJC.0000000000000382
 17. Alter, P., and Rupp, H. (2011) OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation* **124**, e23; author reply e24-25
 18. Cottin, S. C., Sanders, T. A., and Hall, W. L. (2011) The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc* **70**, 215-231
 19. Abeywardena, M. Y., and Head, R. J. (2001) Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovascular research* **52**, 361-371
 20. Thioub, S., Mansourati, J., Corporeau, C., Heylen, E., Delarue, J., and Guerrero, F. (2009) Effects of n-3 fatty acids and acute exercise on endothelium-dependent vasorelaxation in healthy rat aorta. *The British journal of nutrition* **101**, 829-835
 21. Wang, Q., Liang, X., Wang, L., Lu, X., Huang, J., Cao, J., Li, H., and Gu, D. (2012) Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* **221**, 536-543

22. Zgheel, F., Alhosin, M., Rashid, S., Burban, M., Auger, C., and Schini-Kerth, V. B. (2014) Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA: DHA 6: 1. *PLoS ONE* **9**:e105102.
23. Lalich, J. J., and Merkow, L. (1961) Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **10**, 744-750
24. Meyrick, B. O., and Reid, L. M. (1982) *Crotalaria*-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *Am J Pathol* **106**, 84-94
25. Schultze, A. E., and Roth, R. A. (1998) Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **1**, 271-346
26. Wilson, D. W., Segall, H., Pan, L. C., and Dunston, S. K. (1989) Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvascular research* **38**, 57-80
27. Alkon, J., Humpl, T., Manlhiot, C., McCrindle, B. W., Reyes, J. T., and Friedberg, M. K. (2010) Usefulness of the right ventricular systolic to diastolic duration ratio to predict functional capacity and survival in children with pulmonary arterial hypertension. *The American journal of cardiology* **106**, 430-436
28. Lang, R. M., Bierig, M., Devereux, R. B., Flachskampf, F. A., Foster, E., Pellikka, P. A., Picard, M. H., Roman, M. J., Seward, J., and Shanewise, J. (2006) Recommendations for chamber quantification. *European Heart Journal-Cardiovascular Imaging* **7**, 79-108
29. Lindqvist, P., Calcuttea, A., and Henein, M. (2008) Echocardiography in the assessment of right heart function. *European Heart Journal-Cardiovascular Imaging* **9**, 225-234
30. Daskalov, I., Ivanchev, M., and Miletieva, M. (2012) Guidelines for the Echocardiography Assessment of the Right Heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *Review-Cardiovascular Diseases* **43**, 48-52
31. Prie, S., Stewart, D. J., and Dupuis, J. (1998) EndothelinA receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **97**, 2169-2174

32. DeMarco, V. G., Habibi, J., Whaley-Connell, A. T., Schneider, R. I., Heller, R. L., Bosanquet, J. P., Hayden, M. R., Delcour, K., Cooper, S. A., Andresen, B. T., Sowers, J. R., and Dellsperger, K. C. (2008) Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**, H2659-2668
33. Homma, N., Morio, Y., Takahashi, H., Yamamoto, A., Suzuki, T., Sato, K., Muramatsu, M., and Fukuchi, Y. (2006) Genistein, a phytoestrogen, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Respiration; international review of thoracic diseases* **73**, 105-112
34. Robbins, I. M. (2004) Advancing therapy for pulmonary arterial hypertension: can animal models help? *American journal of respiratory and critical care medicine* **169**, 5-6
35. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J., and McMurtry, I. F. (2009) Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **297**, L1013-1032
36. Huang, J., Kaminski, P. M., Edwards, J. G., Yeh, A., Wolin, M. S., Frishman, W. H., Gewitz, M. H., and Mathew, R. (2008) Pyrrolidine dithiocarbamate restores endothelial cell membrane integrity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **294**, L1250-1259
37. Chen, R., Liu, P., Yan, J., and Gu, Y. (2014) Effects of docosahexaenoic acid on hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases* **37**, 109-112
38. Howard, L. S., Grapsa, J., Dawson, D., Bellamy, M., Chambers, J. B., Masani, N. D., Nihoyannopoulos, P., and Simon, R. G. J. (2012) Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard operating procedure. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* **21**, 239-248
39. Kimura, K., Daimon, M., Morita, H., Kawata, T., Nakao, T., Okano, T., Lee, S. L., Takenaka, K., Nagai, R., Yatomi, Y., and Komuro, I. (2015) Evaluation of right ventricle by speckle tracking and conventional echocardiography in rats with right ventricular heart failure. *International heart journal* **56**, 349-353
40. Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K., and Humbert, M. (2003) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* **22**, 358-363

41. Voelkel, N. F., Cool, C., Lee, S. D., Wright, L., Geraci, M. W., and Tuder, R. M. (1998) Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest* **114**, 225S-230S
42. Huertas, A., Perros, F., Tu, L., Cohen-Kaminsky, S., Montani, D., Dorfmüller, P., Guignabert, C., and Humbert, M. (2014) Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay. *Circulation* **129**, 1332-1340
43. Hassoun, P. M., Mouthon, L., Barbera, J. A., Eddahibi, S., Flores, S. C., Grimminger, F., Jones, P. L., Maitland, M. L., Michelakis, E. D., Morrell, N. W., Newman, J. H., Rabinovitch, M., Schermuly, R., Stenmark, K. R., Voelkel, N. F., Yuan, J. X., and Humbert, M. (2009) Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* **54**, S10-19
44. Pullamsetti, S. S., Savai, R., Janssen, W., Dahal, B. K., Seeger, W., Grimminger, F., Ghofrani, H. A., Weissmann, N., and Schermuly, R. T. (2011) Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clin Microbiol Infect* **17**, 7-14
45. Barman, S. A., Chen, F., Su, Y., Dimitropoulou, C., Wang, Y., Catravas, J. D., Han, W., Orfi, L., Szantai-Kis, C., Keri, G., Szabadkai, I., Barabutis, N., Rafikova, O., Rafikov, R., Black, S. M., Jonigk, D., Giannis, A., Asmis, R., Stepp, D. W., Ramesh, G., and Fulton, D. J. (2014) NADPH oxidase 4 is expressed in pulmonary artery adventitia and contributes to hypertensive vascular remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **34**, 1704-1715
46. Tabima, D. M., Frizzell, S., and Gladwin, M. T. (2012) Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 1970-1986
47. Takimoto, E., and Kass, D. A. (2007) Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* **49**, 241-248
48. Redout, E. M., Wagner, M. J., Zuidwijk, M. J., Boer, C., Musters, R. J., van Hardeveld, C., Paulus, W. J., and Simonides, W. S. (2007) Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovascular research* **75**, 770-781
49. Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., Christman, B. W., Weir, E. K., Eickelberg, O., Voelkel, N. F., and Rabinovitch, M.

- M. (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **43**, 13S-24S
50. Morita, K., Ogawa, Y., and Tobise, K. (1996) Effect of endothelium of pulmonary artery vasoreactivity in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Japanese circulation journal* **60**, 585-592
51. Altieri, R. J., Olson, J. W., and Gillespie, M. N. (1986) Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **236**, 390-395
52. Mathew, R., Zeballos, G. A., Tun, H., and Gewitz, M. H. (1995) Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovascular research* **30**, 739-746
53. Jasmin, J.-F., Lucas, M., Cernacek, P., and Dupuis, J. (2001) Effectiveness of a nonselective ETA/B and a selective ETA antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **103**, 314-318
54. Vincent, J. A., Ross, R. D., Kassab, J., Hsu, J. M., and Pinsky, W. W. (1993) Relation of elevated plasma endothelin in congenital heart disease to increased pulmonary blood flow. *The American journal of cardiology* **71**, 1204-1207
55. Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R. P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W. P., and Stewart, D. J. (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* **328**, 1732-1739
56. Nikitopoulou, I., Orfanos, S. E., Kotanidou, A., Maltabe, V., Manitsopoulos, N., Karras, P., Kouklis, P., Armaganidis, A., and Maniatis, N. A. (2016) Vascular endothelial cadherin downregulation as a feature of endothelial transdifferentiation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, ajplung 00156 02014
57. Montani, D., Souza, R., Binkert, C., Fischli, W., Simonneau, G., Clozel, M., and Humbert, M. (2007) Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. *Chest* **131**, 101-108
58. Hill, N. S., Warburton, R. R., Pietras, L., and Klinger, J. R. (1997) Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol (1985)* **83**, 1209-1215
59. Morin, C., Hiram, R., Rousseau, E., Blier, P. U., and Fortin, S. (2014) Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular

- remodeling in experimental pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **307**, H574-H586
60. Yan, J., Chen, R., Liu, P., and Gu, Y. (2013) Docosahexaenoic acid inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension: in vitro and in vivo studies. *International journal of cardiology* **168**, 4111-4116
61. Gorjao, R., Azevedo-Martins, A. K., Rodrigues, H. G., Abdulkader, F., Arcisio-Miranda, M., Procopio, J., and Curi, R. (2009) Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacol Ther* **122**, 56-64
62. Dhein, S., Michaelis, B., and Mohr, F. W. (2005) Antiarrhythmic and electrophysiological effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**, 202-211
63. Calder, P. C. (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *British journal of clinical pharmacology* **75**, 645-662
64. Mozaffarian, D., and Wu, J. H. (2011) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology* **58**, 2047-2067
65. Aoki, H., Hisada, T., Ishizuka, T., Utsugi, M., Kawata, T., Shimizu, Y., Okajima, F., Dobashi, K., and Mori, M. (2008) Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 509-515
66. Serhan, C. N., and Petasis, N. A. (2011) Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev* **111**, 5922-5943

Table 3. Characteristics of the different omega-3 fatty acid products

Fatty acids	Purity (<i>in</i> %)	Ratio EPA:DHA	Content of Omega-3 EPA-DHA as EE		Sum Omega-3 as EE (mg/g)
			EPA (mg/g)	DHA (mg/g)	
EPA:DHA	93.4	01:01	476	386	934
EPA:DHA	91.3	06:01	694	121	913
EPA:DHA	46.0	06:01	352	65	460
EPA	99.5		991		995
DHA	98.6			945	986

Table 2. Echocardiography parameters of the inferior vena cava, the right atrium and the left ventricular.

	Control	Omega	MCT	MCT+OM
RA diameter (mm)	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.9 ± 0.2*	2.2 ± 0.1#
RA area (mm ²)	9 ± 0.2	9.1 ± 0.1	13.3 ± 0.1*	10.2 ± 0.1#
IVC diameter (mm)	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1*	2.4 ± 0.1
IVC systolic area (mm ²)	3.6 ± 0.7	3.6 ± 0.4	4.5 ± 0.3*	3.9 ± 0.2
LV Stroke volume (ml)	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.20 ± 0.01*	0.24 ± 0.01
LV End-diastolic (mm)	7.9 ± 0.1	7.8 ± 0.1	6 ± 0.1*	6.4 ± 0.1
LV End-systolic (mm)	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.2
Septal wall thickness (mm)	1.5 ± 0.1	1.6 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1
LVP wall thickness (mm)	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1
LV area (mm ²)	53.3 ± 1.1	50.2 ± 3.4	35.1 ± 0.7	39.6 ± 2.0
LV fractional shortening (%)	45.3 ± 1.5	42.9 ± 2.2	39.4 ± 1.4	42.5 ± 2.4
LV ejection fraction (%)	70 ± 1.7	67.2 ± 2.4	62.1 ± 1.6	66.4 ± 2.9

*All values are mean ± SEM, n = 6-11/group. IVC, inferior vena cave, MCT, monocrotaline, LV, left ventricle; RV, right ventricle. *P < 0.05 versus control; #P < 0.05 versus MCT.*

Figure 1. Oral intake of EPA:DHA 6:1 prevents MCT-induced pulmonary hypertension and right heart dysfunction. (A) Mean pulmonary artery pressure (mPAP) was monitored by catheter inserted into the jugular vein and advanced to the pulmonary artery. (B) Right ventricular systolic pressure (RVSP) was evaluated by echocardiography from tricuspid regurgitation velocity ($RVSP = 4 \times V_{max}^2$). (C) Cardiac output (CO) and (D) heart rate (HR) were monitored by pulsed wave Doppler. (E) Systemic arterial pressure (SAP). All measurements are presented as the average of three cardiac cycles. Values are given as mean \pm SEM. $\cdot P < 0.05$ versus control, $\cdot P < 0.05$ versus MCT.

Figure 2. The EPA:DHA 6:1 treatment prevents MCT-induced right ventricular remodeling and hypertrophy. (A) Echocardiographic views of the right ventricle. (B) RV end-diastolic (RVEDD), (C) end-systolic diameter (RVESD), (D) RV fractional area changes (RVFAC). Images were obtained by two-dimensional and M-mode echocardiography from a parasternal short-axis view. (E) RV hypertrophy was assessed by Fulton's index, calculated as RV to LV weight ratio $[RV/(LV+S)]$, (F) RV weight/body weight and (G) LV+S weight/body weight. Values are given as mean \pm SEM. $\cdot P < 0.05$ versus control, $\cdot P < 0.05$ versus MCT.

Figure 3. The EPA:DHA 6:1 treatment prevents the MCT-induced RV cardiomyocytes hypertrophy (A) and macrophages infiltration (B). Quantitative morphometric analyses of cardiomyocytes section area were done using hematoxylin and eosin and gomori's blue trichrome staining of right and left ventricle walls. (B) Evaluation of macrophage infiltration was performed by quantitative analysis of the macrophages counted in 10 fields of immunohistochemical staining with CD68 antibody (20X, objective). Results are presented as representative micrographies (left) and corresponding cumulative data (right). Values are given as mean \pm SEM. $\cdot P < 0.05$ versus control, $\cdot P < 0.05$ versus MCT.

Figure 4. The EPA:DHA 6:1 treatment prevents MCT-induced pulmonary artery remodeling. (A) Notching of the pulse wave Doppler profile in the pulmonary artery outflow, (B) pulmonary artery diameter, (C) pulmonary artery acceleration time (PAAT), (D) pulmonary vascular resistance (PVR) and (E) pulsatility. Pulse-wave Doppler of pulmonary outflow was recorded in the parasternal view at the level of the aortic valve. PAAT was measured from the time of onset of systolic flow to peak pulmonary outflow velocity. Values are given as mean \pm SEM. $\cdot P < 0.05$ versus control, $\cdot P < 0.05$ versus MCT.

Figure 5. The EPA:DHA 6:1 treatment prevents pulmonary vascular remodeling, pulmonary macrophages and lymphocytes infiltration in MCT-treated rats. (A) Representative images of hematoxylin-eosin, gomori's blue trichrom and immunohistochemical (α -actin as a measure of the dedree of muscularization) staining of lung section in rats for determination of the wall thickness and wall area of small pulmonary arteries sized $< 20 \mu\text{m}$. Images are shown on the left and quantification analysis on the right. Sixteen pulmonary arteries from 6 rats/experimental group were analyzed ($n = 8$). (B) Immunofluorescent (*green*) and immunohistochemical (*purple arrows*) staining with antibodies against CD68 [ED-1] for detection of macrophages and CD3 for lymphocytes T, respectively. Quantification of positive cells was analyzed of the fraction area occupied macrophages and lymphocytes T were counted in 10 different fields. Scale bar, $20 \mu\text{m}$ (20X objective). Values are given as mean \pm SEM. $\cdot P < 0.05$ versus control, $\cdot P < 0.05$ versus MCT.

Figure 6. The EPA:DHA 6:1 treatment prevents MCT-induced vascular oxidative stress in pulmonary arterioles. (A) The determination of the vascular formation of ROS formation was done in unfixed cryosections of the right lung using the redox-sensitive probe dihydroethidium (DHE). (B) The characterization of the source of ROS formation was performed in presence of either N-acetylcysteine (NAC, antioxydant 1 mM), VAS-2870 (NADPH oxidase inhibitor, $10 \mu\text{M}$), N-nitro-L-arginine (LNA, NO synthase inhibitor, $300 \mu\text{M}$), indomethacin (Indo, cyclooxygenase inhibitor, $10 \mu\text{M}$), or MRK (inhibitors of the mitochondrial respiration chain, myxothiazol, $0.5 \mu\text{M}$ + rotenone, $1 \mu\text{M}$ + potassium cyanide (KCN), $1 \mu\text{M}$) for 30 min before DHE staining. Thereafter, ethidium fluorescence was determined by confocal laser-scanning microscope (Leica SP2 UV DM IRBE). (C and D) Nitric oxide (NO.) and superoxide anion (O_2^-) measured by electron paramagnetic resonance in small pulmonary arterioles. Values are given as mean \pm SEM. $\cdot P < 0.05$ versus control, $\cdot P < 0.05$ versus MCT.

Figure 7. The EPA:DHA 6:1 treatment prevents MCT-induced changes of protein expression in pulmonary arterioles. Protein expression levels were determined in unfixed cryosections of right lung, the determination of the expression level of endothelial NO synthase (eNOS), NADPH oxidase subunits p22^{phox} and p47^{phox}, cyclooxygenase (COX-1 and COX-2), ET-1 receptors (ET_A, and ET_B) and the AT1R was done by

immunofluorescence. All samples for immunofluorescence studies were observed using a confocal laser-scanning microscope (Leica SP2 UV DM IRBE).

Figure 8. The EPA:DHA 6:1 treatment prevents MCT-induced endothelial dysfunction in the main pulmonary artery as assessed in organ chamber. The concentration-contraction curves in response to phenylephrine (A and B) and the concentration-relaxation curves to acetylcholine in pulmonary artery rings pre-contracted by phenylephrine (10^{-6} M) (C and D) were constructed in the absence (A and C) and the presence (B and D) of eNOS inhibitor (L-NA, 300 μ M) to assess the role of the basal formation of endothelial NO. (n = 7 to 11). Values are given as mean \pm SEM. $P < 0.05$ versus control, $P < 0.05$ versus MCT.

Figure 1.

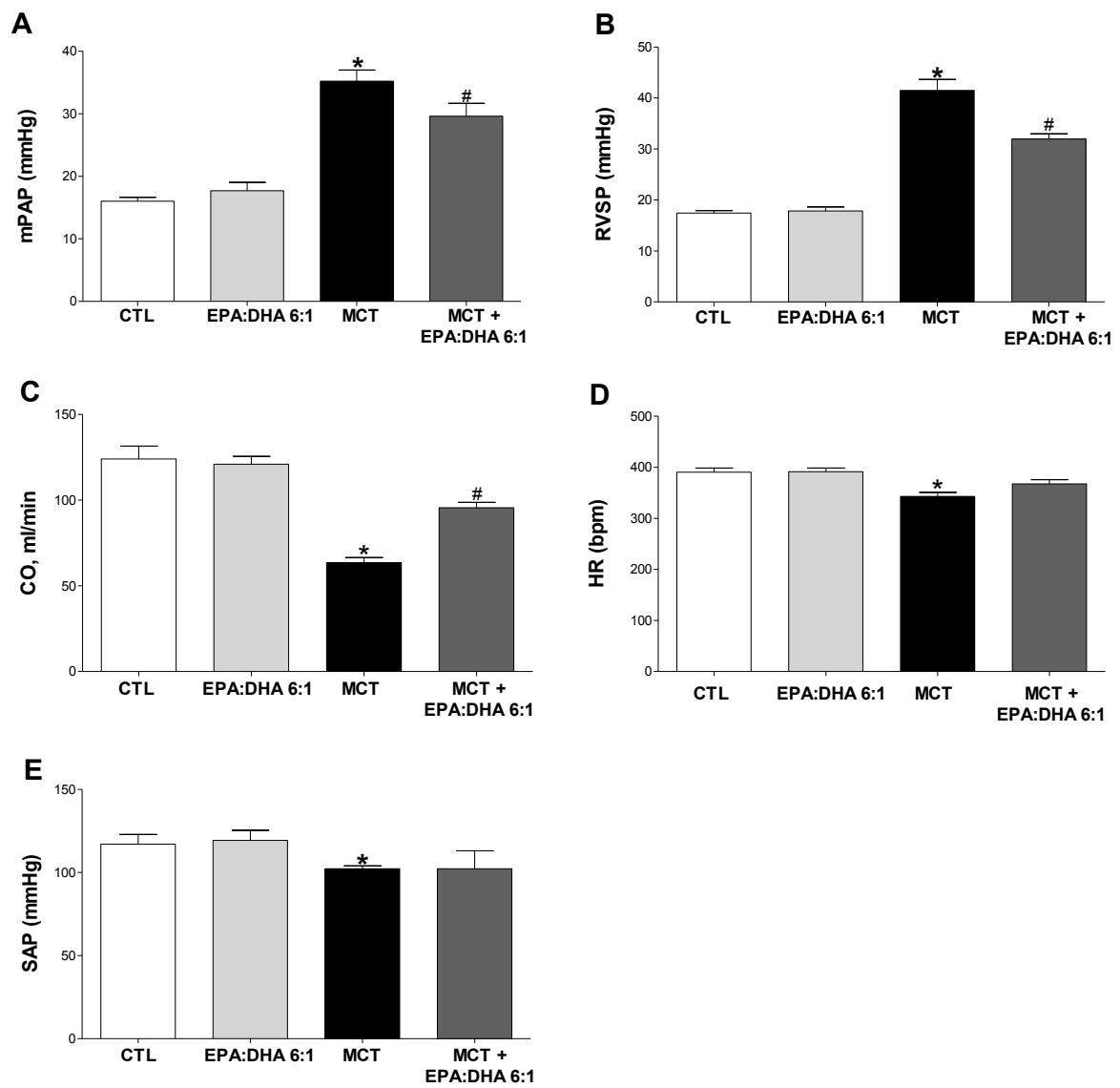


Figure 2.

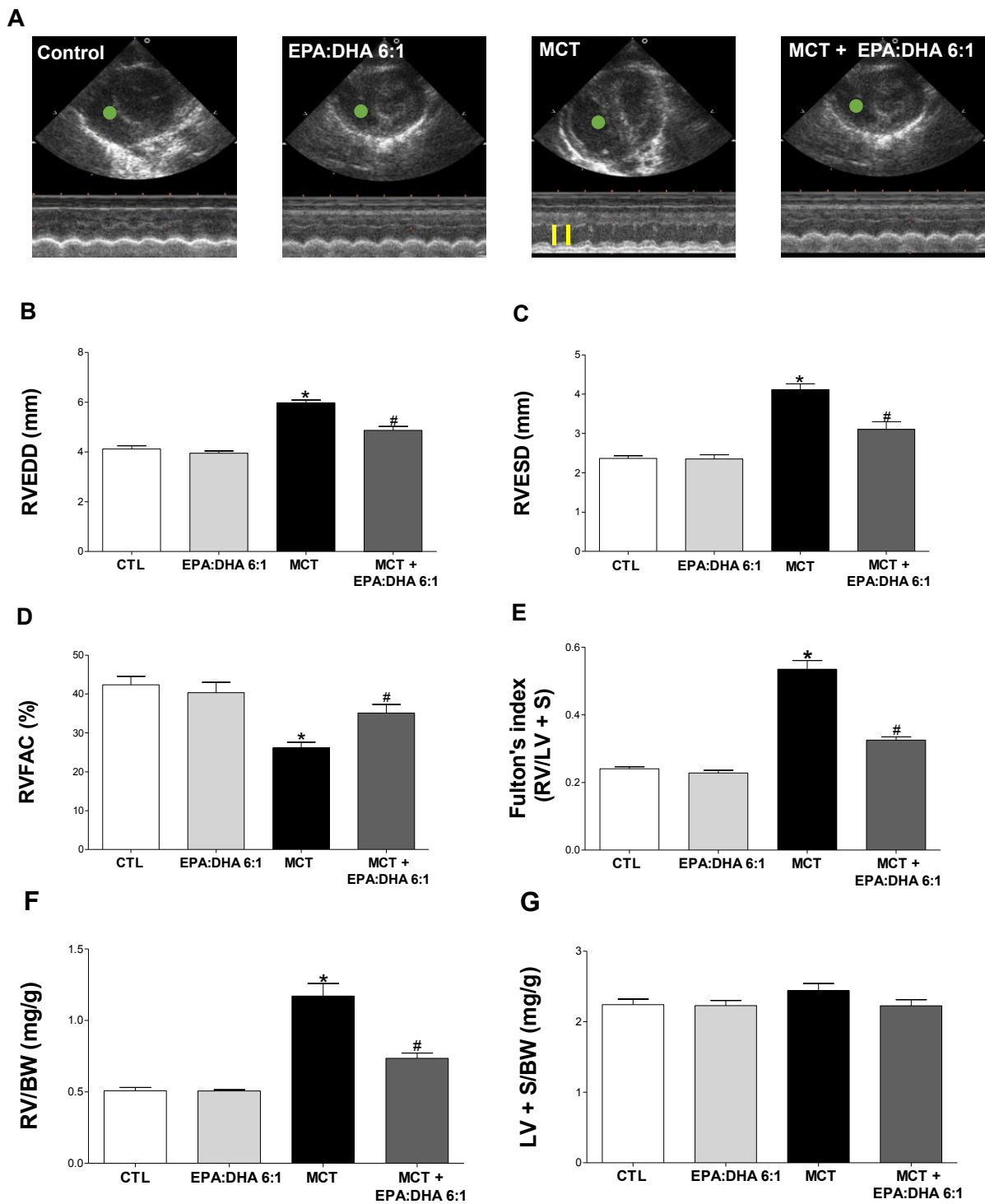


Figure 3.

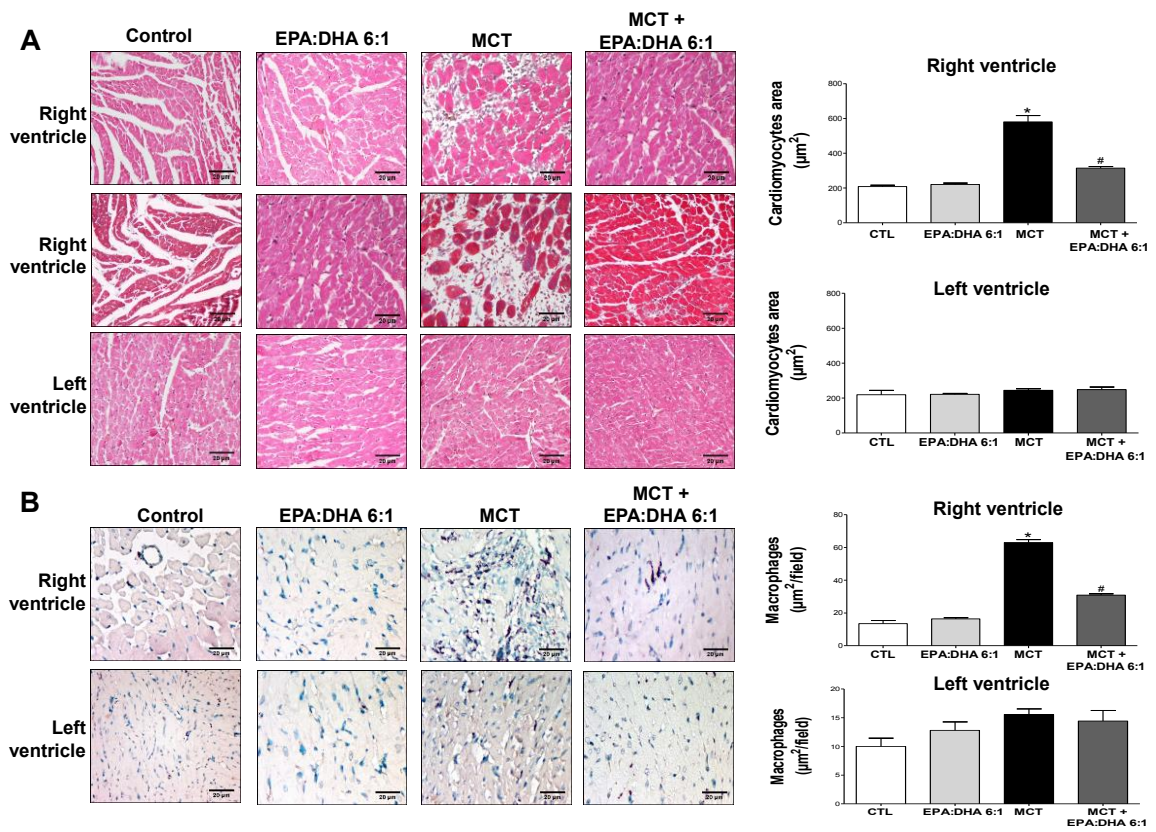
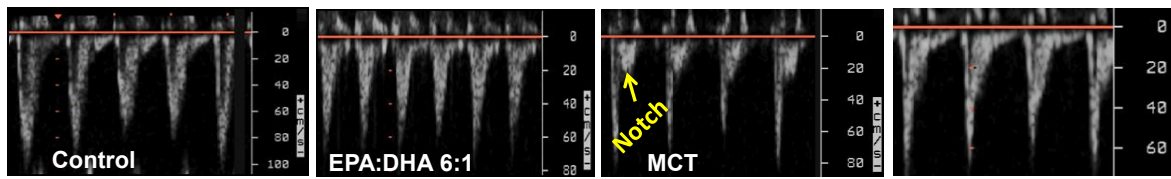
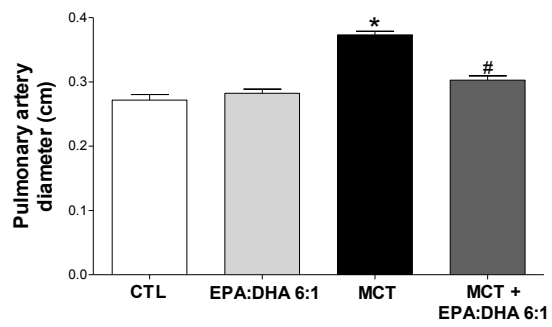


Figure 4.

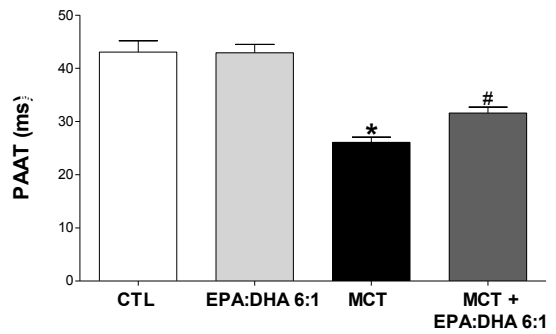
A



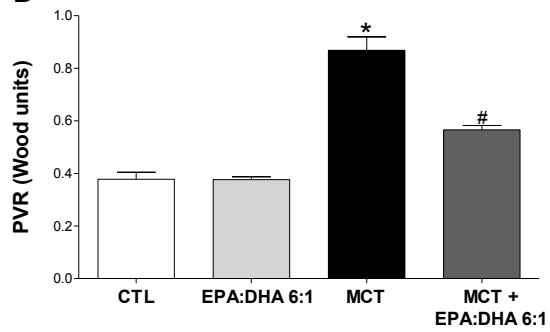
B



C



D



E

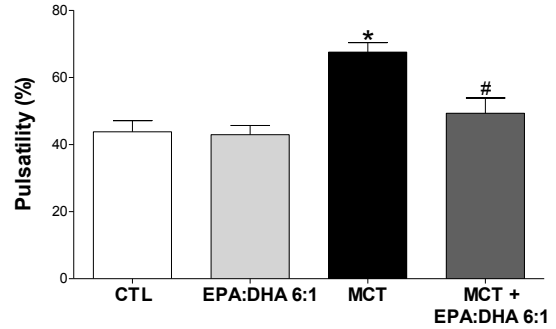


Figure 5.

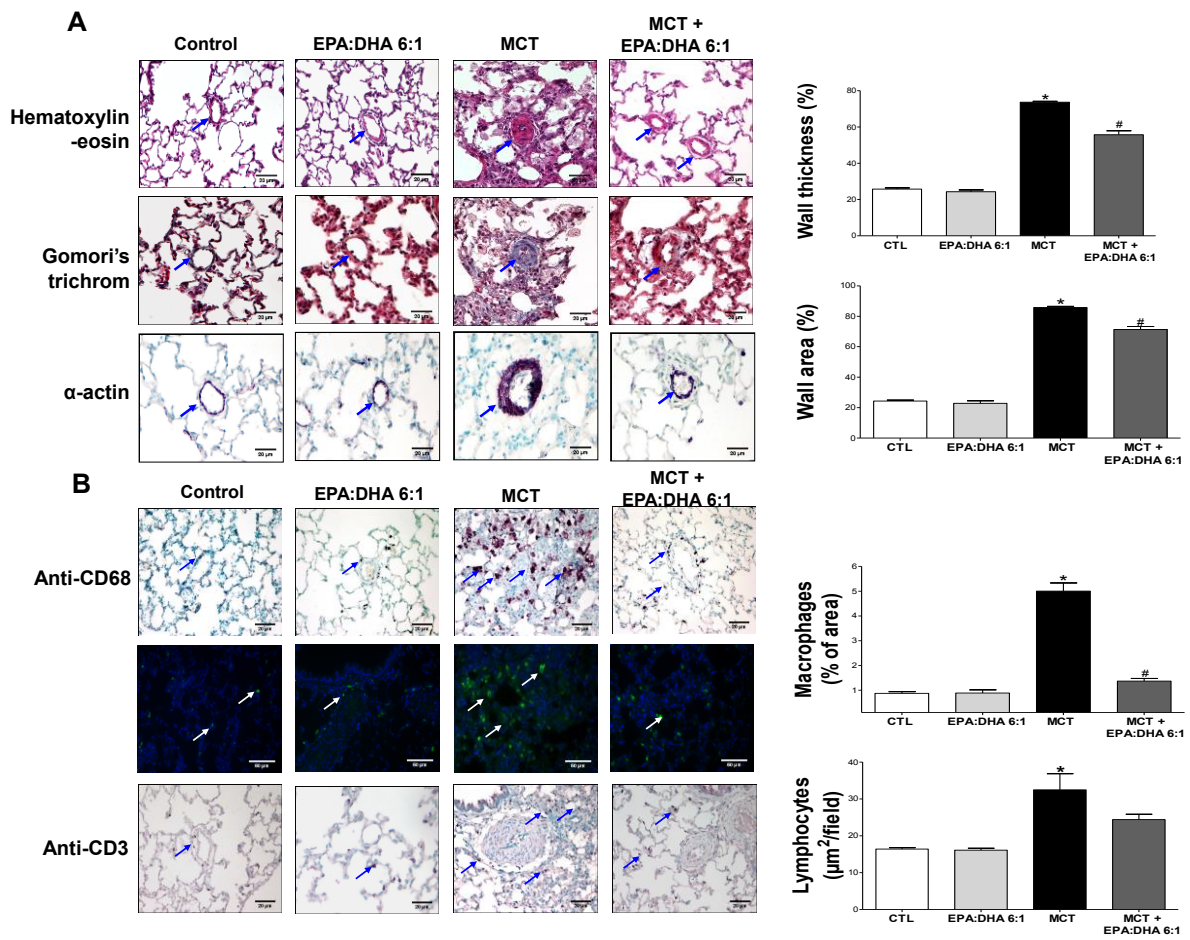


Figure 6.

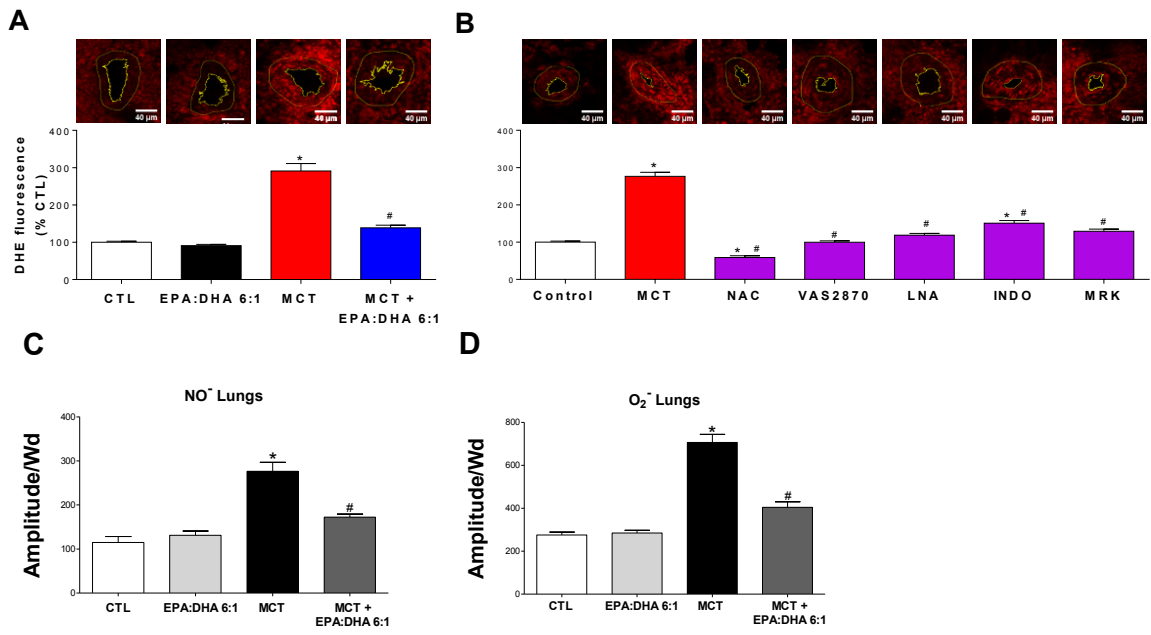


Figure 7.

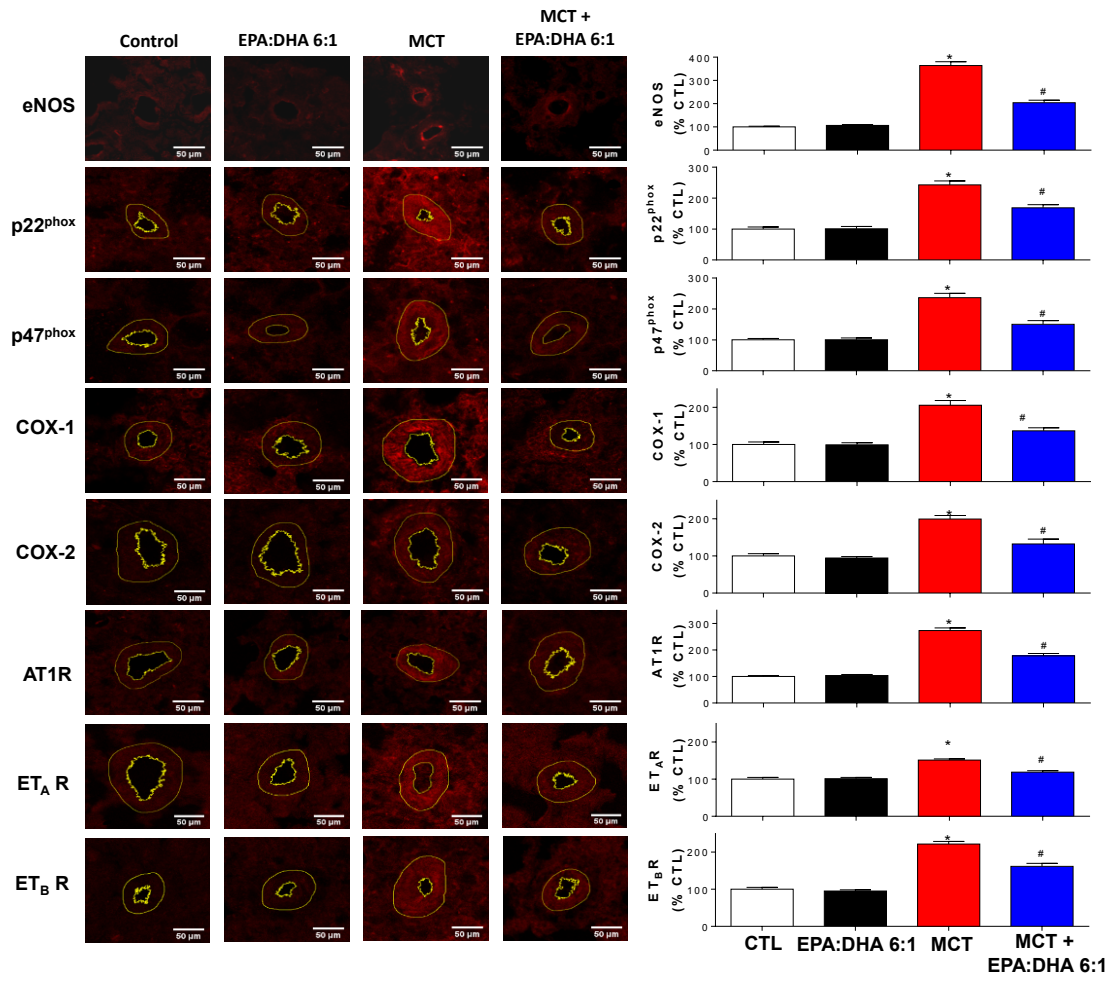
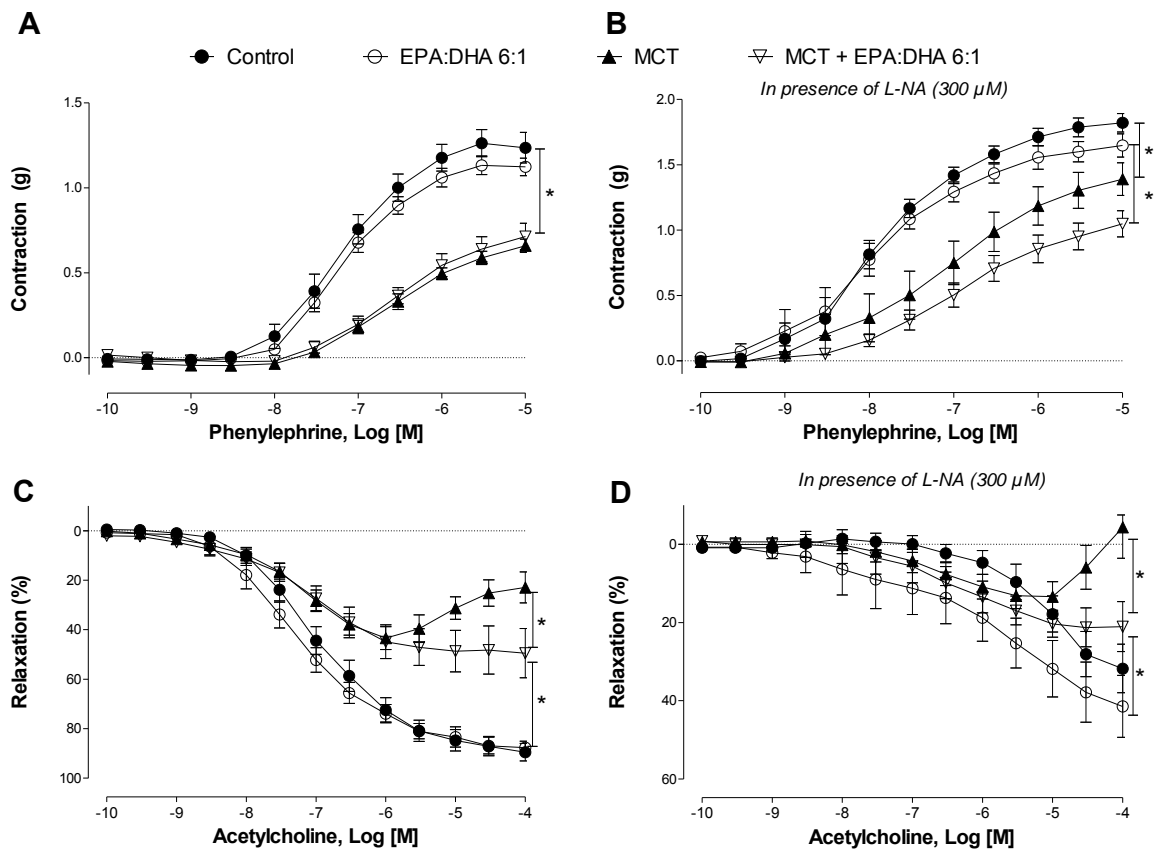


Figure 8.



Article 2

Les émulsions lipidiques utilisées en nutrition parentérale induisent une dysfonction endothéliale des artères coronaires de porc : rôle du stress oxydant et des prostanoides vasoconstricteurs

Potential of lipid emulsions used in parenteral nutrition to induce endothelial dysfunction in porcine coronary artery rings: Role of oxidative stress and cyclooxygenase-derived vasoconstrictors

Said Amissi*, Julie Boisramé-Helms*, Mélanie Burban, Sherzad K. Rashid, Antonio J León-González, Cyril Auger, Florence Toti, Ferhat Meziani, Valérie B. Schini-Kerth

Les émulsions lipidiques sont couramment utilisées dans le cadre de la nutrition parentérale, permettant un apport énergétique dérivé des acides gras au patient en état d'agression, lorsque la nutrition orale ou entérale est insuffisante ou contre-indiquée. Bien qu'améliorant le statut énergétique du patient, l'apport d'acides gras peut entraîner l'induction d'une dysfonction endothéliale laquelle va favoriser le développement des facteurs de risques cardiovasculaires par l'hypertriglycéridémie, le LDL oxydée, la dysfonction endothéliale, l'inflammation et le stress oxydant.

L'objectif de cette étude est de déterminer les impacts des émulsions lipidiques de la nutrition parentérale sur la fonction endothéliale dans un modèle d'artère coronaire et les mécanismes responsables des effets délétères de ces émulsions lipidiques :

- Déterminer le rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale induite par les émulsions lipidiques, ainsi que la nature et les sources enzymatiques des espèces réactives d'oxygène.
- Identifier les mécanismes moléculaires contribuant à l'altération des composantes NO et EDH (hyperpolarisation dépendante de l'endothélium) et le rôle des EDCFs (Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium).
- Déterminer si les oméga-3 sont capables de protéger la fonction endothéliale vis-à-vis des effets délétères des émulsions.

L'approche expérimentale a impliqué des études de réactivités vasculaires sur des anneaux d'artères coronaires de porc réalisées dans des chambres à organes isolés. La fonction endothéliale est évaluée par la mesure des composantes NO et EDH de relaxation. Le stress oxydant a été évalué sur des sections de cryostats d'artères coronaires à l'aide de la sonde fluorescente dihydroéthidium (DHE).

En effet, nos études expérimentales indiquent que l'incubation d'anneaux d'artère coronaire avec différentes formulations d'émulsions lipidiques industrielles de la nutrition parentérale humaine comme le Lipidem[®], le Médialipide[®] ou l'Intralipide[®] entraîne une diminution significative de la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à la bradykinine, indiquant l'induction d'une dysfonction endothéliale. Cette dysfonction endothéliale est en partie associée à une diminution des composantes NO et EDH de la relaxation et à une augmentation des prostanoïdes vasoconstricteurs.

Potential of lipid emulsions used in parenteral nutrition to induce endothelial dysfunction in porcine coronary artery rings: Role of oxidative stress and cyclooxygenase-derived vasoconstrictors

Said Amissi¹, Julie Boisramé-Helms^{2,3}, Mélanie Burban¹, Sherzad K. Rashid¹, Antonio J León-González¹, Cyril Auger¹, Florence Toti¹, Ferhat Meziani^{2, 3}, Valérie B Schini-Kerth¹ *

¹UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France, ²EA 7293, Fédération de Médecine translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, ³Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

LIPIDS-16-0074 Revision

*** Correspondence:**

Valérie B Schini-Kerth, PhD
UMR CNRS 7213, Faculty of Pharmacy
74, route du Rhin
67401 Illkirch, France
Phone: +33 3 68 85 41 27
Fax: +33 3 68 85 43 13
E-mail: valerie.schini-kerth@unistra.fr

Abstract

Lipid emulsions for parenteral nutrition are used to provide calories and essential fatty acids for patients. They have been associated with hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and metabolic stress, which may promote the development of endothelial dysfunction in patients. The aim of the present study was to determine whether five different industrial lipid emulsions may affect the endothelial function of coronary arteries. Porcine coronary arteries were incubated with lipid emulsions 0.5, 1 or 2% (v/v) for 30 min before the determination of vascular reactivity in organ chambers and the level of oxidative stress using the redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE). Incubation of coronary artery rings with either Lipidem[®], Medialipid[®] containing long- and medium-chain triglycerides (LCT/MCT), or SMOFlipid[®] containing LCT, MCT, omega-9 and -3, significantly reduced the bradykinin-induced endothelium-dependent relaxation, affecting both the nitric oxide (NO) and endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) components, whereas, Intralipid[®] containing LCT (soybean oil) and ClinOleic[®] containing LCT (Soybean and olive oil) did not have such an effect. The endothelial dysfunction induced by Lipidem[®] was significantly improved by indomethacin, a cyclooxygenase (COX) inhibitor, inhibitors of oxidative stress (N-acetylcysteine, superoxide dismutase, catalase) and transition metal chelating agents (neocuproine, tetrathiomolybdate, deferoxamine and L-histidine). Lipidem[®] significantly increased the arterial wall level of oxidative stress. The present findings indicate that lipid emulsions containing LCT/MCT induce endothelial dysfunction in coronary artery rings by blunting both NO- and EDH-mediated relaxations. The Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction is associated with increased vascular oxidative stress and the formation of COX-derived vasoconstrictor prostanoids.

Keywords: Cyclooxygenase • Endothelial dysfunction • Lipid emulsion • Medium-chain triglycerides • Oxidative stress

Abbreviations

DHA	Docosahexaenoic Acid (22:6n-3)
DHE	Dihydroethidium
EDH	Endothelium-Dependent Hyperpolarization
EPA	Eicosapentaenoic Acid (20:5n-3)
KCN	Potassium cyanide
LCT	Long Chain Triglycerides
MCT	Medium Chain Triglycerides
MnTMPyP	Mn (III) Tetrakis(1-methyl-4 pyridyl) porphyrin
NAC	N-acetylcysteine
NO	Nitric Oxide
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
VAS-2870	3-Benzyl-7-(2-benzoxazolyl) thio-1, 2, 3-triazolo (4, 5-d) pyrimidine

Introduction

Lipid emulsions are commonly used to provide a nutritional source of calories and to prevent essential fatty acids deficiency in critically ill patients [1-3]. Their benefits include the reduction of the potential side effects of high glucose perfusion, an essential fatty acids supply, and an improved nitrogen balance [4]. Several studies have reported that infusion of lipid emulsions is related to hypertriglyceridemia [5], hypercholesterolemia and metabolic stress, leading to acute elevation of the free fatty acid (FFA) level, which may promote the development of endothelial dysfunction by decreasing nitric oxide (NO) formation [6-9]. Furthermore, *ex vivo* studies have reported that some individual fatty acids, such as lauric acid and stearic acid, attenuate the endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in rabbit aorta rings at physiological concentrations [10].

Formulations of clinically used lipid emulsions have different proportions of fatty acids, and, their biological properties may vary depending on their composition. The first

generation lipid emulsion Intralipid® containing a large amount of long-chain triglycerides (LCT) from soybean oil including the n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) linoleic acid (18:2n-6) and a relatively low amount of α -linolenic acid (18:3n-3) [11, 12]. Linoleic acid is readily converted to arachidonic acid (20:4n-6) and subsequently metabolized *via* the cyclooxygenase (COX) and lipo-oxygenase (LOX) pathways to pro-inflammatory mediators, such as prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes [13]. The second generation lipid emulsions with a lower PUFA content have been developed by partially replacing the LCT-containing soybean oil by various oils such as the medium chain triglycerides (MCT)-containing coconut oil (Medialipid®), LCT-containing olive oil (ClinOleic®), LCT/MCT-containing fish oil (Lipidem®) or, as a third-generation of lipid emulsions, LCT/MCT-containing olive and fish oils, rich sources of long-chain ω -3 PUFAs (SMOFlipid®) [14].

Omega-3 long-chain PUFAs, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which can compete with arachidonic acid for the production of less inflammatory eicosanoids, are absent in vegetable oils [15]. A recent study has indicated the ability of both EPA, DHA and, in particular, the EPA:DHA 6:1 ratio to induce endothelium-dependent relaxations of porcine coronary artery rings, and to increase the endothelial formation of nitric oxide (NO) subsequent to the redox-sensitive activation of the phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathways leading to the phosphorylation of eNOS at Ser 1177 [16].

Therefore, the aim of the present study was to determine the effect of five different industrial lipid emulsions on the endothelial function of isolated porcine coronary arteries. Bradykinin is a potent inducer of endothelium-dependent relaxations both human coronary and also in porcine coronary artery [17]. Moreover, the relaxation to bradykinin in the human and the porcine coronary includes both NO and also endothelium-dependent hyperpolarization [17].

Materials and Methods

Lipid emulsions and reagents

The following lipid emulsions (20%) were tested: Intralipid[®], Lipidem[®], Medialipid[®], ClinOleic[®] and SMOf lipid[®]. The composition of the lipid emulsions in terms of sources of oil and major fatty acids are presented in Table 1 and table 2 respectively. Medialipid[®] and Lipidem[®] were obtained from B. Braun (Boulogne Billancourt, France), Intralipid[®] and SMOf lipid[®] from Fresenius-Kabi (Sèvres, France), and ClinOleic[®] from Baxter (Maurepas, France). Reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), except U46619 (9,11-dideoxy-9 α -methanoepoxy prostaglandin F₂ α) from Cayman Chemical (Ann. Arbor, MI, USA), apamin (APA) and charybdotoxin (CTX) from Latoxan (Valence, France), and the SOD mimetic MnTMPyP from Enzo Life Sciences (Lausen, Switzerland).

Vascular reactivity studies

Vascular reactivity studies were performed in isolated porcine coronary artery rings as previously described [18, 19]. Pig hearts were collected from the local slaughterhouse (COPVIAL, Holtzheim, France). Briefly, the left circumflex coronary arteries were excised, carefully cleaned of connective tissue in Krebs bicarbonate solution and cut into rings (3-4 mm length). In some preparations, the endothelium was mechanically removed by rubbing the intimal surface of rings with a pair of forceps. Rings with or without endothelium were suspended in organ chambers containing oxygenated (95% O₂; 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution (mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 25, and D-glucose 11, pH 7.4, 37°C) for the determination of changes in isometric tension. The coronary artery rings were stretched to 5 g of tension and then allowed to equilibrate for 60 min. After the equilibration period, the rings were exposed to a Krebs bicarbonate solution containing a high concentration of potassium (80 mM) until reproducible contractile responses were obtained. After a 30 min washout period, the rings were contracted with the thromboxane mimetic U46619 (1-60 nM) to about 80% of the maximal contraction before addition of bradykinin (BK, 0.3 μ M) to check the presence of a functional endothelium. After washout and a 30 min equilibration period, the rings were again contracted with U46619 to a plateau level

before the construction of concentration-relaxation response curve to either BK or the NO donor sodium nitroprusside (SNP). The endothelium-dependent relaxation was determined in response to BK (0.1 nM to 1 μ M) and the endothelium-independent relaxation in response to SNP (0.1 nM to 1 μ M).

To assess the effect of lipid emulsions on the endothelial function, coronary artery rings were incubated for 30 min either with Intralipid[®], Medialipid[®], Lipidem[®] ClinOleic[®] or SMOFlipid[®] diluted in Krebs solution to a final concentration of 0.5, 1 or 2% (v/v) before the addition of U46619 and the subsequent construction of a concentration-relaxation curve to bradykinin. The control rings were performed in absence of lipid emulsions in Krebs bicarbonate solution. Relaxations are expressed as a percentage based on the sub-maximal contraction induced by U46619.

The bradykinin-induced endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery is mediated by both NO and EDH responses [20, 21]. In some experiments, rings were incubated with Lipidem[®] in the presence of different pharmacological modulators for 30 min before contraction with U46619. The NO-mediated component of the relaxation was determined in the presence of the non-selective COX inhibitor indomethacin (10 μ M) and the Ca²⁺-dependent K⁺ channels inhibitors charybdotoxin (CTX, 100 nM) plus apamin (APA, 100 nM) to inhibit the formation of prostanoids and the endothelium-derived hyperpolarization (EDH)-mediated responses, respectively. The EDH-mediated component of the relaxation was determined in the presence of indomethacin (10 μ M) and the non-selective NO synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 300 μ M) to avoid the participation of vasoactive prostanoids and NO, respectively.

To examine the role of oxidative stress in the vascular dysfunction, the rings were incubated for 30 min with a ROS modulator, such as N-acetylcysteine (NAC, 100 μ M), MnTMPyP (membrane permeant superoxide dismutase mimetic, 100 μ M), superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL), polyetyleneglycol-catalase (PEG-catalase, membrane permeant catalase, 500 U/mL), catalase (500 U/mL), the copper chelators neocuproine (10 μ M), bathocuproine (10 μ M), and tetrathiomolybdate (TTM, 10 μ M), the iron chelator deferoxamine (50 μ M) and the zinc chelator L-histidine (50 μ M), in combination with a lipid emulsion.

Determination of vascular oxidative stress

The redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate the *in situ* formation of ROS following the method described previously [22, 23]. DHE enters the cells and is oxidized by $O_2^{\cdot-}$ to yield ethidium, which binds to DNA to produce bright red fluorescence. Briefly, freshly dissected porcine coronary artery rings (3-4 mm in length) were embedded in Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and frozen in a liquid nitrogen bath and stored at -80°C. Cryosections (25 μ m unfixed) were incubated in a humidified chamber for 30 min with Lipid emulsion 1% diluted in PBS 1X. Then, the sections were incubated further for 30 min in PBS solution containing DHE (2.5 μ M, Sigma) at 37°C in a light-protected humidified chamber to determine the *in situ* formation of ROS.

To characterize the nature and source of ROS, rings were incubated with several ROS modulators including SOD (500 U/mL), PEG-SOD (500 U/mL), catalase, (500 U/mL), PEG-catalase (500 U/mL), VAS-2870 (NADPH oxidase inhibitor, 10 μ M), L-NA (300 μ M), indomethacin (10 μ M), or inhibitors of the mitochondrial respiration chain (KMR: potassium cyanide (KCN), 1 μ M + myxothiazol, 0.5 μ M + rotenone, 1 μ M) for 30 min at 37 °C before the addition of DHE. Sections were then washed three times, mounted in DAKO and cover-slipped. Four sections of each preparation were examined on a fluorescence microscope (Leica SP2 UV DM IRBE laser scanning confocal microscope, SAS, Nanterre, France) using a X20 objective. Quantification of fluorescence levels was performed using Image J 1.42q software (NIH, USA).

Electron paramagnetic resonance (EPR)

Porcine coronary artery rings were incubated in Krebs-Hepes solution with Lipid emulsion 1% for 30 min. To measure superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production, the rings were allowed to equilibrate in deferoxamine-chelated Krebs-Hepes solution containing 1 hydroxy-3 methoxycarbonyl 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen, Germany) (500 mM), deferoxamine (25 mM), and DETC (5 mM) under constant temperature (37°C) for 1 hour. The reaction was stopped by freezing the samples in liquid nitrogen for EPR spectroscopy analysis. Values were expressed as arbitrary units per milligram weight of dried tissue (A/Wd).

Statistical analysis

All values are expressed as the mean \pm SEM of *n* different experiments. Statistical analysis was performed using one-way and two-way analysis of variance test (ANOVA), followed by Bonferroni's post-hoc test as appropriate using GraphPad Prism software (version 5.04 for Windows, GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA). A *P* value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Lipid emulsions affect endothelial relaxation

The bradykinin-induced relaxations in coronary artery rings with endothelium were significantly reduced in rings pre-incubated with either Lipidem[®], Medialipid[®] or SMOFlipid[®], and only minimally affected in those incubated with Intralipid[®] or ClinOleic[®] (Fig.1). The relaxation induced by 30 nM of bradykinin was 90.7 ± 3.1 % and 54.5 ± 6.6 % in the control rings and the Lipidem[®] 1% -treated rings, respectively ($P < 0.05$; Fig. 1a).

In contrast, the different lipid emulsions affected minimally the SNP-induced concentration-dependent relaxation curve in rings without endothelium (Fig. 1b). Amongst the lipid emulsions, Lipidem[®] induced the most pronounced impairment of the bradykinin-induced relaxation at 1%, therefore all further experiments were performed with Lipidem[®]. Both 1% and 2%, but not 0.5% of Lipidem[®], significantly reduced the bradykinin-induced relaxation (Fig. 1c). In contrast, 1% Lipidem[®] did not significantly affect the serotonin (5-HT)-induced contraction in rings either with or without endothelium (Fig. 1d).

The effect of 1% Lipidem[®] on U46619-induced contractions in both intact and endothelium denuded coronary artery rings was shown in Figure 1e. Since U46619 at 30 μ M increased the contraction by at less 50% whereas no such effect was observed in rings without endothelium (Figure 1e). These new findings indicate that Lipidem[®] increases the contractile response to U46619 to some extent but not that to 5-HT (Figure 1d).

Lipid emulsions affect both the NO and EDH component of the endothelium-dependent relaxation

Incubation of coronary artery rings with endothelium in 1% Lipidem[®] for 30 min significantly reduced the bradykinin-induced endothelium-dependent relaxations, affecting both the NO-mediated component, assessed in the presence of the combination of indomethacin plus CTX and APA (65.4 ± 9.0 vs 93.2 ± 2.2 % in the Lipidem[®]-treated rings and the control rings, respectively) (Fig. 2a), and the EDH-

mediated component assessed in the presence of indomethacin plus L-NA (38.7 ± 8.20 vs 87.1 ± 2.6 % in the Lipidem[®]-treated rings and the control rings, respectively) (Fig. 2b). In the presence of the COX inhibitor indomethacin, relaxations to bradykinin were significantly improved in rings incubated with 1% Lipidem[®] (Fig. 2c).

ROS modulators reduce the Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction

To evaluate the contribution of oxidative stress in the endothelial dysfunction induced by Lipidem[®], the bradykinin response was assessed in the presence of different antioxidants or metal chelators. The Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction was markedly improved in presence either of NAC, SOD, MnTMPyP, catalase or PEG-catalase (Fig. 3).

The Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction was also significantly improved in the presence of the membrane-permeable copper chelators neocuproine, bathocuproine, and tetrathiomolybdate, the membrane-permeable iron chelator deferoxamine, and the zinc chelator L-histidine (Fig. 4).

Lipid emulsions increase the vascular formation of ROS

Since lipid emulsions such as Intralipid[®] and Lipofundin (MCT/LCT[®]) have been shown to increase the vascular formation of ROS [19], the possibility that Lipidem[®] affects the vascular level of oxidative stress was assessed using the redox-sensitive fluorescent probe DHE. Lipidem[®] increased the formation of ROS as indicated by the increased ethidium fluorescence signal throughout the coronary artery section in comparison to the control artery (Fig. 5). The most pronounced fluorescence signal was observed at the luminal surface of the artery, presumably at the endothelium (Fig. 5).

In order to determine the nature and source of ROS, arterial sections were treated with different pharmacological tools and the formation of ROS was examined. The Lipidem[®]-induced enhanced formation of ROS in the coronary arterial wall was significantly reduced by native SOD and catalase and their membrane permeant derivatives PEG-SOD and PEG-catalase (Fig. 5), and by the transition metal chelator TTM (Fig. 6). In addition, the increased DHE fluorescence

signal was also significantly reduced by indomethacin (a COX inhibitor), L-NA (NO synthase inhibitor), VAS-2870 (a NADPH oxidase inhibitor), and by the KMR mixture (inhibitors of the mitochondrial respiration chain, KCN, myxothiazol, and rotenone) (Fig. 7). In addition, we have confirmed the formation of ROS by electron paramagnetic resonance using coronary artery segments. The lipid emulsions containing a MCTs (Lipidem[®] and Medialipid[®]) increased the formation of superoxide anions in intact coronary artery arteries.

Discussion

The present study has investigated the effect of different lipid emulsion formulations on both the vascular and the endothelial functions. Both the MCT and LCT-containing lipid emulsions such as Lipidem[®], Medialipid[®] and SMOFlipid[®] significantly blunted the bradykinin-induced endothelium-dependent relaxation in coronary artery rings. In contrast, lipid emulsions containing either only LCT from soybean (Intralipid[®]) or a mixture of LCT from soybean and olive oil (ClinOleic[®]), did not affect relaxations to bradykinin. Moreover, since the lipid emulsions affecting the endothelial function did not affect the vascular relaxations induced by the NO donor sodium nitroprusside, they predominantly affect the endothelial function rather than that of the vascular smooth muscle. However, we have decided to select only Lipidem[®] for further characterization of the endothelial dysfunction, because this lipid emulsion induced the greatest impairment of the endothelial function compared to the 4 other commercial lipid emulsions. In particular, we have characterized the mechanism underlying the deleterious effect Lipidem[®] on the coronary artery endothelial function and in particular the role of oxidative stress using various pharmacological tools, and the redox-sensitive fluorescent probe dihydroethidium.

The present results further indicate that the Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction affects both the NO and the EDH components of the relaxation, and that the EDH component is affected to a greater extent than the NO component in coronary artery rings. In addition, Lipidem[®] increases the contractile response to U46619 to some extent but not that to 5-HT. Such a difference might be due to different signal transduction mechanisms in response to the activation of the thromboxane prostanoid receptor and 5-HT₂ receptors at the endothelium promoting vasoconstriction following exposure to Lipidem[®].

The endothelium-protecting effect of the COX-inhibitor indomethacin in the present study indicates that the COX pathway is a mediator of fatty acid action on endothelium-dependent vasodilation. Furthermore, the COX pathway has been shown to play an important role in the endothelial function under both physiological and pathological conditions [24]. The COX-1 isoform is constitutively expressed in human endothelial cells, whereas endothelial COX-2 is induced mainly during the

inflammatory response [25]. COX catalyzes the synthesis of Prostaglandin H₂ (PGH₂), which is the precursor of both vasorelaxant prostanoids, such as prostacyclin (PGI₂), and vasoconstrictor prostanoids, such as thromboxane A₂ (TXA₂) [26]. A high content of n-6 PUFAs, such as linoleic acid, in lipid emulsions has been related to a major production of pro-inflammatory mediators derived from arachidonic acid, including prostaglandin F₂ alpha (PGF-2 alpha) and TXA₂ through the COX pathway [27], and leukotrienes through the LOX pathway [28, 29], resulting in an increased risk of lipid peroxidation, endothelial dysfunction and related vascular injury [7, 30-32]. In the present study, increased availability of arachidonic acid might have stimulated COX dependent production of vasoconstrictors PGH₂ and TXA₂. Linoleic acid is the most abundant fatty acid contained both in Lipidem[®] and Medialipid[®], supporting the view that Lipidem[®] might induce endothelial dysfunction by activating arachidonic acid metabolism through a COX-dependent pathway. Therefore, the potential contribution of arachidonic acid-derived vasoconstrictors to the Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction was assessed by using the COX inhibitor indomethacin. Indeed, indomethacin improved the endothelial dysfunction induced by Lipidem[®] in intact coronary artery rings. These findings are in good agreement with previous ones indicating that COX inhibition protected the endothelium-dependent vasodilation against elevated circulating fatty acid levels in humans [33] and also improved the endothelium-dependent relaxation of microvessels in a hypercholesterolemic porcine model of chronic ischemia [34].

Previous studies have reported that lipid emulsions are able to increase the circulating triglycerides level and the vascular formation of ROS promoting endothelial dysfunction [35-38]. In previous in vitro studies, the antioxidant vitamin C partly restores the impaired acetylcholine-induced relaxation induced by free fatty acids, and triacylglycerol attenuates NO production by increasing reactive oxygen species production [39, 40]. Considering previous reports, in our current study indicates that Lipidem[®] and Medialipid[®] MCT/LCT (1%)-increased ROS production higher than SMOFLipid[®], Intralipid[®] and ClinOleic[®]. However, different antioxidants (scavenger of superoxide anions) (N-acetylcysteine, superoxide dismutase and catalase) and transition metals chelators (neocuproine, deferoxamine and L-histidine) significantly prevented the endothelial dysfunction induced by Lipidem[®]

MCT/LCT, suggesting that Lipidem[®] MCT/LCT (1%) impaired bradykinin-induced NO-and EDH-mediated relaxation may be associated with vascular superoxide anion production. These findings indicate that transition metals most likely participate in the Lipidem[®]-induced vascular formation of ROS, presumably through the conversion of H₂O₂ to more reactive ROS, such as the hydroxyl radical (OH⁻) through the Fenton Haber-Weiss reaction [41]. The present findings further extend these previous observations by showing that oxidative stress is generated by several sources including NADPH oxidase, COXs, uncoupled eNOS and the mitochondrial respiration chain, which will subsequently reduce the bioavailability of NO. In order to determine the major enzymatic sources of ROS in the Lipidem[®]-induced vascular formation of ROS, the effect of several inhibitors, including indomethacin (COX inhibitor), LNA (NO synthase inhibitor), VAS-2870 (NADPH oxidase inhibitor) and a combination of inhibitors of the mitochondrial respiration chain (KCN, myxothiazol, and rotenone) was assessed. All the pharmacological modulators significantly reduced the Lipidem[®]-induced vascular formation of ROS, indicating the involvement of several sources including COX, NADPH oxidase, uncoupled eNOS and the mitochondrial respiration chain, to increase the generation of ROS, which will subsequently reduce the bioavailability of NO. The L-arginine-NO pathways is influenced by oxidative stress, and a key events appears to be the reaction between superoxide anion and NO to form the free radical peroxynitrite [42]. Previous findings have shown that parenteral administration of Medialipid[®], but not Intralipid[®], transiently increased the mean aortic blood pressure and systemic vascular resistance in conscious dogs [43]. Medialipid[®] also enhanced the pro-inflammatory and oxidative/nitrosative markers including COX-2, NO, O₂⁻ and pIκB in the aorta and heart associated with an exacerbation of the peritonitis-induced vascular dysfunction in a rat model of septic shock [44]. Similarly, Lipofundin[®] containing LCT/MCT and Intralipid[®] inhibited acetylcholine-induced NO-mediated relaxations in the rat aorta [45]. Altogether, these findings suggest that although the American Society of Parenteral and Enteral Nutrition identified MCT containing oils as a potentially beneficial additive to lipid emulsions [46], further studies are required to better assess the effect of MCT, LCT, and a mixture of LCT/MCT on the pivotal protective effect on the endothelial on the vascular system. Considering previous reports, in our current study, Lipidem[®] MCT/LCT-mediated enhanced

inhibition of bradykinin-induced NO- and EDH-mediated relaxation may be associated with differences in fatty acids components that are contained in lipid emulsion such as increased medium-chain fatty acids and decreased long-chain fatty acids. Our data may have clinical implications. Lipid emulsions are frequently used for parenteral nutrition and triglycerides esterified with fatty acids with a chain longer than 16 carbons atoms are commonly used. These emulsions contain not only a greater proportion of linoleic acid, which is natural precursor of the series 2 prostaglandins [47].

In conclusion, the present findings indicate that lipid emulsions containing medium chain triglycerides (MCTs) including Lipidem[®] and Medialipid[®] significantly blunted the bradykinin-induced endothelium-dependent relaxation in porcine coronary artery rings and that this effect is due, at least in part, to an increased vascular level of oxidative stress involving COX, NADPH oxidase, uncoupled eNOS and the mitochondrial respiration chain, which promotes endothelial dysfunction by decreasing both the NO and the EDH components.

Conflict of interest the authors declare no conflict of interest.

References

1. Chan S, McCowen KC, and Bistran B (1998) Medium-chain triglyceride and n-3 polyunsaturated fatty acid-containing emulsions in intravenous nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1: 163-169
2. Ziegler TR (2009) Parenteral nutrition in the critically ill patient. *The New England journal of medicine* 361: 1088-1097
3. Boisramé-Helms J, Toti F, Hasselmann M, and Meziani F (2015) Lipid emulsions for parenteral nutrition in critical illness. *Progress in lipid research* 60: 1-16
4. Tilley SL, Coffman TM, and Koller BH (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 108: 15-23
5. Markowitz S, and Neal JM (2009) Immediate lipid emulsion therapy in the successful treatment of bupivacaine systemic toxicity. *Regional anesthesia and pain medicine* 34: 276
6. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B, and Baron AD (1997) Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest* 100: 1230-1239
7. Gosmanov AR, Smiley DD, Peng L, Siquiera J, Robalino G, Newton C, and Umpierrez GE (2012) Vascular effects of intravenous intralipid and dextrose infusions in obese subjects. *Metabolism: clinical and experimental* 61: 1370-1376
8. de Kreutzenberg SV, Crepaldi C, Marchetto S, Calo L, Tiengo A, Del Prato S, and Avogaro A (2000) Plasma free fatty acids and endothelium-dependent vasodilation: effect of chain-length and cyclooxygenase inhibition. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85: 793-798
9. Steer P, Basu S, Lithell H, Vessby B, Berne C, and Lind L (2003) Acute elevations of medium- and long-chain fatty acid have different impacts on endothelium-dependent vasodilation in humans. *Lipids* 38: 15-19

10. Edirisinghe I, McCormick Hallam K, and Kappagoda CT (2006) Effect of fatty acids on endothelium-dependent relaxation in the rabbit aorta. *Clinical science* 111: 145-151
11. Carpentier YA, Simoens C, Siderova V, el Nakadi I, Vanweyenberg V, Eggerickx D, and Deckelbaum RJ (1997) Recent developments in lipid emulsions: relevance to intensive care. *Nutrition* 13: 73S-78S
12. Waitzberg DL, Torrinhas RS, and Jacintho TM (2006) New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30: 351-367
13. Liang B, Wang S, Ye YJ, Yang XD, Wang YL, Qu J, Xie QW, and Yin MJ (2008) Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 14: 2434-2439
14. Calder PC (2009) Hot topics in parenteral nutrition. Rationale for using new lipid emulsions in parenteral nutrition and a review of the trials performed in adults. *Proc Nutr Soc* 68: 252-260
15. Mayer K, Grimm H, Grimminger F, and Seeger W (2002) Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis. *British Journal of Nutrition* 87: S69-S75
16. Zgheel F, Alhosin M, Rashid S, Burban M, Auger C, and Schini-Kerth VB (2014) Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA: DHA 6: 1.
17. Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, and Vanhoutte PM (1993) Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 92: 2867-2871
18. Auger C, Kim J-H, Trinh S, Chataigneau T, Popken AM, and Schini-Kerth VB (2011) Fruit juice-induced endothelium-dependent relaxations in isolated porcine coronary arteries: evaluation of different fruit juices and purees and optimization of a red fruit juice blend. *Food & function* 2: 245-250
19. Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, and Schini-Kerth VB (2007) Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res* 73: 404-413
20. Rivilla F, Vallejo S, Peiro C, and Sanchez-Ferrer CF (2012) Characterization of endothelium-dependent relaxations in the mesenteric vasculature: a

- comparative study with potential pathophysiological relevance. *J Pediatr Surg* 47: 2044-2049
21. Heaps CL, Robles JC, Sarin V, Mattox ML, and Parker JL (2014) Exercise training-induced adaptations in mediators of sustained endothelium-dependent coronary artery relaxation in a porcine model of ischemic heart disease. *Microcirculation*
 22. Rashid SK, Khodja NI, Auger C, Alhosin M, Boehm N, Oswald-Mammosser M, and Schini-Kerth VB (2014) Probiotics (VSL# 3) prevent endothelial dysfunction in rats with portal hypertension: role of the angiotensin system.
 23. Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, and Davidson BL (1998) Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82: 1298-1305
 24. Félétou M, Huang Y, and Vanhoutte PM (2010) Vasoconstrictor prostanoids. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 459: 941-950
 25. Feletou M, Huang Y, and Vanhoutte PM (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164: 894-912
 26. Ricciotti E, and FitzGerald GA (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31: 986-1000
 27. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, and James MJ (2001) Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *Journal of immunology* 167: 2831-2838
 28. Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E, and Rousseau E (2009) Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 296: L130-139
 29. Adkins Y, and Kelley DS (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of nutritional biochemistry* 21: 781-792
 30. de Kreutzenberg SV, Puato M, Kiwanuka E, Del Prato S, Pauletto P, Pasini L, Tiengo A, and Avogaro A (2003) Elevated non-esterified fatty acids impair

- nitric oxide independent vasodilation, in humans: evidence for a role of inwardly rectifying potassium channels. *Atherosclerosis* 169: 147-153
31. Krohn K, and Koletzko B (2006) Parenteral lipid emulsions in paediatrics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 319-323
 32. Umpierrez GE, Smiley D, Robalino G, Peng L, Kitabchi AE, Khan B, Le A, Quyyumi A, Brown V, and Phillips LS (2009) Intravenous intralipid-induced blood pressure elevation and endothelial dysfunction in obese African-Americans with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 609-614
 33. Steer P, Millgard J, Basu S, Lithell H, Vessby B, Berne C, and Lind L (2003) Vitamin C, diclophenac, and L-arginine protect endothelium-dependent vasodilation against elevated circulating fatty acid levels in humans. *Atherosclerosis* 168: 65-72
 34. Chu LM, Robich MP, Bianchi C, Feng J, Liu Y, Xu SH, Burgess T, and Sellke FW (2012) Effects of cyclooxygenase inhibition on cardiovascular function in a hypercholesterolemic swine model of chronic ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 302: H479-488
 35. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, and Nawata H (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49: 1939-1945
 36. Li JM, and Shah AM (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1014-1030
 37. Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, Higa N, Matsuzaki T, Noguchi K, Ueda S, Sakanashi M, and Takasu N (2007) Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology* 148: 160-165
 38. Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, Sasaki S, Inoue T, Fujimura Y, Miura D, and Takayanagi R (2014) Metformin and liraglutide ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKC-NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 232: 156-164

39. Osanai H, Okumura K, Hayakawa M, Harada M, Numaguchi Y, Mokuno S, Murase K, Matsui H, Toki Y, Ito T, and Hayakawa T (2000) Ascorbic acid improves postischemic vasodilatation impaired by infusion of soybean oil into canine iliac artery. *Journal of cardiovascular pharmacology* 36: 687-692
40. Ilan E, Tirosh O, and Madar Z (2005) Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *The Journal of nutrition* 135: 2090-2095
41. Gutteridge JM, and Halliwell B (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 561-564
42. Beckman JS, and Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology* 271: C1424-1437
43. Van de Velde M, Wouters PF, Rolf N, Van Aken H, and Vandermeersch E (1998) Comparative hemodynamic effects of three different parenterally administered lipid emulsions in conscious dogs. *Critical care medicine* 26: 132-137
44. Boisrame-Helms J, Said A, Burbhan M, Delabranche X, Stiel L, Zobairi F, Hasselmann M, Schini-Kerth V, Toti F, and Meziani F (2014) Medium-chain triglyceride supplementation exacerbates peritonitis-induced septic shock in rats: role on cell membrane remodeling. *Shock* 42: 548-553
45. Ok SH, Lee SH, Yu J, Park J, Shin IW, Lee Y, Cho H, Choi MJ, Baik J, Hong JM, Han JY, Lee HK, Chung YK, and Sohn JT (2015) Lipid Emulsion Attenuates Acetylcholine-Induced Relaxation in Isolated Rat Aorta. *BioMed research international* 2015: 871545
46. Vanek VW, Seidner DL, Allen P, Bistran B, Collier S, Gura K, Miles JM, Valentine CJ, Kochevar M, Novel Nutrient Task Force IFEW, American Society for P, and Enteral Nutrition Board of D (2012) A.S.P.E.N. position paper: Clinical role for alternative intravenous fat emulsions. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 27: 150-192
47. Leaf A, and Weber PC (1988) Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *The New England journal of medicine* 318: 549-557

48. Granato D, Blum S, Rössle C, Le Boucher J, Malnoë A, and Dutot G (2000) Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 24: 113-118
49. Wanten GJ, and Calder PC (2007) Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *The American journal of clinical nutrition* 85: 1171-1184
50. Grimm H, Mertes N, Goeters C, Schlotzer E, Mayer K, Grimminger F, and Fürst P (2006) Improved fatty acid and leukotriene pattern with a novel lipid emulsion in surgical patients. *European journal of nutrition* 45: 55-60

Figure legends

Fig. 25 Effect of lipid emulsions on the vascular reactivity to bradykinin (a, c), sodium nitroprusside (b) and serotonin (d) in porcine coronary artery rings with or without endothelium. Coronary artery rings were incubated with either Intralipid[®], Medialipid[®], ClinOleic[®], Lipidem[®], or SMOFlipid[®] for 30 min before contraction with U46619, an analogue of thromboxane A₂, and subsequent relaxation to bradykinin (BK), sodium nitroprusside (SNP). The effect of 1% Lipidem[®] on the concentration-contraction curve to serotonin (5-HT) (d) or U46619 (e) in endothelium-intact and –denuded coronary artery rings and the level of precontraction induced by U46619 in control and Lipidem[®] 1%-treated coronary artery rings with endothelium before the construction of a concentration-dependent relaxation to bradykinin (f). Rings were exposed to 1% Lipidem[®] for 30 min before the construction of a concentration-induced contraction curve to U46619. Results are shown as mean ± SEM of 7-9 different experiments. * $P < 0.05$ versus control rings.

*Fig. 2 Characterization of the Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction in coronary artery rings. Coronary artery rings with a functional endothelium were incubated with Lipidem[®] 1% (v/v) for 30 min before contraction with U46619. NO-mediated relaxations were determined in the presence of indomethacin (10 μM) and charybdotoxin plus apamin (both at 100 nM) to avoid the participation of vasoactive prostanoids and EDH, respectively (a). EDH-mediated relaxations were assessed in the presence of indomethacin (10 μM) and N^G-nitro-L-arginine (300 μM) to rule out the formation of vasoactive prostanoids and NO, respectively (b). The role of cyclooxygenase-derived vasoactive prostanoids was determined in the presence of indomethacin (10 μM) (c). Results are shown as means ± SEM of 5-7 different experiments. * $P < 0.05$ versus control, # $P < 0.05$ versus Lipidem[®] 1%.*

Fig. 3 Role of oxidative stress in the endothelial dysfunction induced by Lipidem[®]. Coronary artery rings with endothelium were incubated with Lipidem[®] and an antioxidant N-acetylcysteine (NAC, 100 μM (a), native superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL or a membrane-permeant SOD mimetic (MnTMPyP, 100 μM (b), native catalase (CAT, 500 U/mL,) or a membrane-permeant catalase (PEG-CAT, 500 U/mL (c) for 30 min before contraction with U46619. The results are expressed as mean ± SEM of 5-7 different experiments. # $P < 0.05$ versus Lipidem[®] 1 %.

Fig. 4 Role of transition metals in the endothelial dysfunction induced by Lipidem[®]. Coronary artery rings with endothelium were incubated with Lipidem[®] and either with the copper chelating agents: neocuproine (10 μ M), bathocuproine (10 μ M), or tetrathiomolybdate (TTM, 10 μ M) ((a), the zinc chelator L-histidin (50 μ M), or the iron chelator deferoxamine (50 μ M) (b) for 30 min before contraction with U46619. The results are expressed as means \pm SEM of 7-9 different experiments. * P < 0.05 versus Lipidem[®] 1%.

*Fig. 5 Lipidem[®]-induced oxidative stress in coronary artery sections. Cryosections of coronary arteries were incubated with Lipidem[®] 1% (v/v) at 37°C for 30 min in the presence or absence of either superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL), PEG-SOD (500 U/mL), catalase (500 U/mL) or PEG-catalase (500 U/mL) for 30 min before the addition of dihydroethidium (DHE, 2.5 μ M). Thereafter, the level of fluorescence was determined by confocal microscopy. Upper panels show representative fluorescence staining; lower panels corresponding cumulative data for endothelial staining. Results are shown as means \pm SEM (n = 5). * P < 0.05 versus control, # P < 0.05 versus Lipidem[®] 1%.*

*Fig. 6 Role of transition metals in the vascular oxidative stress induced by Lipidem[®]. Frozen coronary artery sections were exposed to either a copper chelating agents such as neocuproine (Neo, 10 μ M), bathocuproine (Batho, 10 μ M), tetrathiomolybdate (TTM, 10 μ M), an iron chelating agent deferoxamine (Defero, 50 μ M), or a zinc chelating agent L-histidine (Hist, 50 μ M) at 37°C for 30 min before staining with dihydroethidium (DHE, 2.5 μ M). Thereafter, ethidium fluorescence was determined by confocal microscopy. Upper panels show representative fluorescence staining; lower panels corresponding cumulative data for endothelial staining. Results are shown as means \pm SEM (n = 5). * P < 0.05 versus control, # P < 0.05 versus Lipidem[®] 1%.*

Fig. 7 Role of several sources of oxidative stress in the Lipidem[®]-induced vascular oxidative stress. Frozen coronary artery sections treated with Lipidem[®] were exposed either to indomethacin (Indo, cyclooxygenase inhibitor, 10 μ M), L-NA (NO synthase inhibitor, 300 μ M), VAS-2870 (NADPH oxidase inhibitor, 10 μ M), or inhibitors of the mitochondrial respiration chain (KCN 1 μ M, myxothiazol 0.5 μ M and rotenone 1 μ M) at 37°C for 30 min before staining with dihydroethidium (DHE, 2.5 μ M) (a). Thereafter, ethidium fluorescence was determined by confocal microscopy. Upper panels show representative fluorescence staining; lower panels corresponding cumulative data for endothelial staining. Lipid emulsions containing MCTs increase the vascular formation of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) assessed by electron paramagnetic resonance in intact porcine coronary artery rings (b).

*Results are shown as means \pm SEM (n = 4). *P < 0.05 versus control, #P < 0.05 versus Lipidem[®] 1%.*

Tables

Table 1 Oil source of the different lipid emulsions [23, 48]

	Intralipid[®]	Medialipid[®]	ClinOleic[®]	Lipidem[®]	SMOFLipid[®]
Oil source (% by weight)					
Soybean oil (LCT)	100	50	20	40	30
Coconut oil (MCT)	0	50	0	50	30
Fish oil (n-3)	0	0	0	10	15
Olive oil (n-9)	0	0	80	0	25

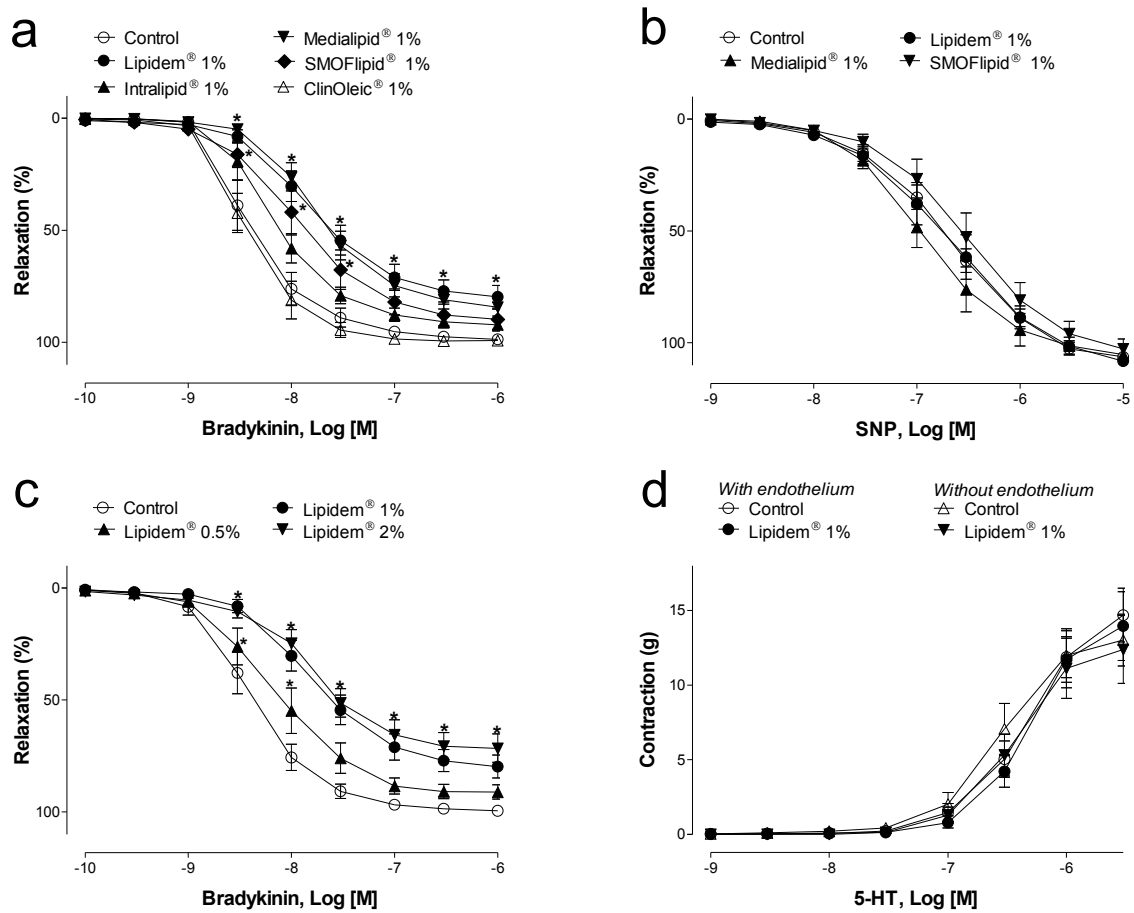
Table 2 Composition of the different lipid emulsions [23, 49, 50]

		Intralipid®	Medialipid®	ClinOleic®	Lipidem®	SMOFLipid®
Typical FA composition						
(% of total FA)						
Caproic	6:0		0.5			Trace
Caprylic	8:0		28.5		30.0	10.0
Capric	10:0		20.0		19.5	11.0
Lauric	12:0		1.0			Trace
Myristic	14:0			Trace	0.5	1.0
Palmitic	16:0	11.0	7.5	12.0	6.0	10.0
Stearic	18:0	4.0	2.0	2.0	2.5	3.5
Palmitoleic	16:1n-7			1.5	0.5	1.5
Oleic	18:1n-9	24.0	11.0	62.0	8.0	31.0
Linoleic	18:2n-6	53.0	29.0	19.0	24.5	20.0
α-linolenic	18:3n-3	8.0	4.5	2.5	3.5	2.0
Arachidonic	20:4n-6					
Eicosapentaenoic	20:5n-3				3.5	3.0
Docosapentaenoic	22:5n-3				3.0	Trace
Docosahexaenoic	22:6n-3				2.5	2.0
	n-3/n-6	0.15	0.16	0.13	0.51	0.35
α-tocopherol (μM)		87.0	502.0	75.0	562.0	500.0
(mg/100 mL)		3.75	21.62	3.23	24.21	21.54

FA: Fatty acids

Figures

Fig 1. Effect of lipid emulsions on the vascular reactivity to bradykinin (a, c), sodium nitroprusside (b) and serotonin (d) in porcine coronary artery rings with or without endothelium



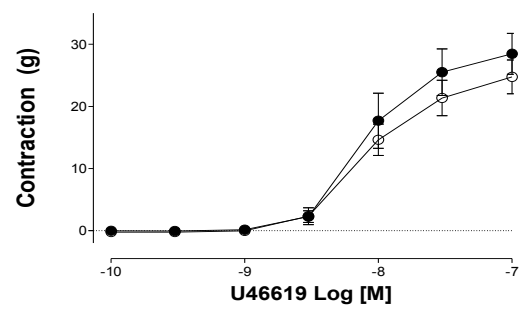
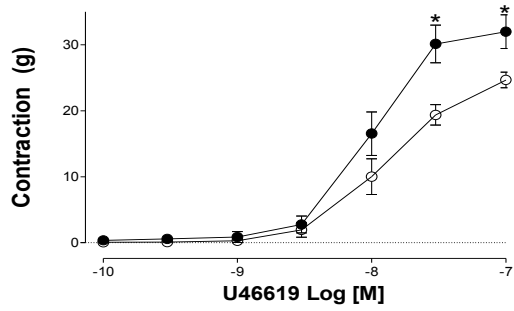
With endothelium

Without endothelium

○ Control

● Lipidem® 1%

e



f

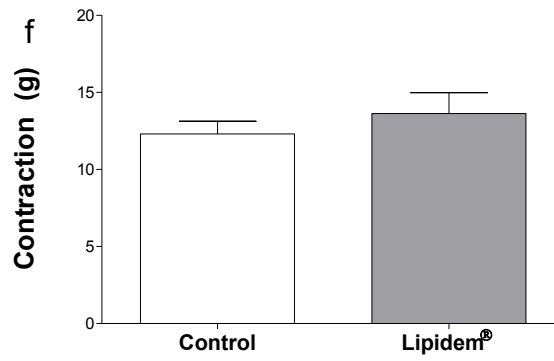


Fig. 2 Characterization of the Lipidem[®]-induced endothelial dysfunction in coronary artery rings

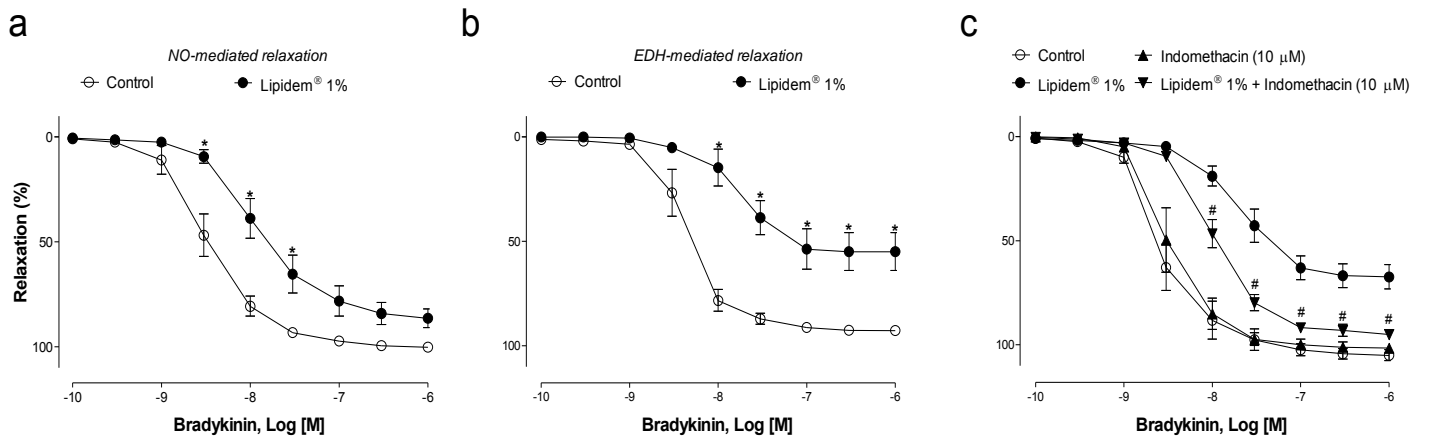


Fig. 3 Role of oxidative stress in the endothelial dysfunction induced by Lipidem[®]

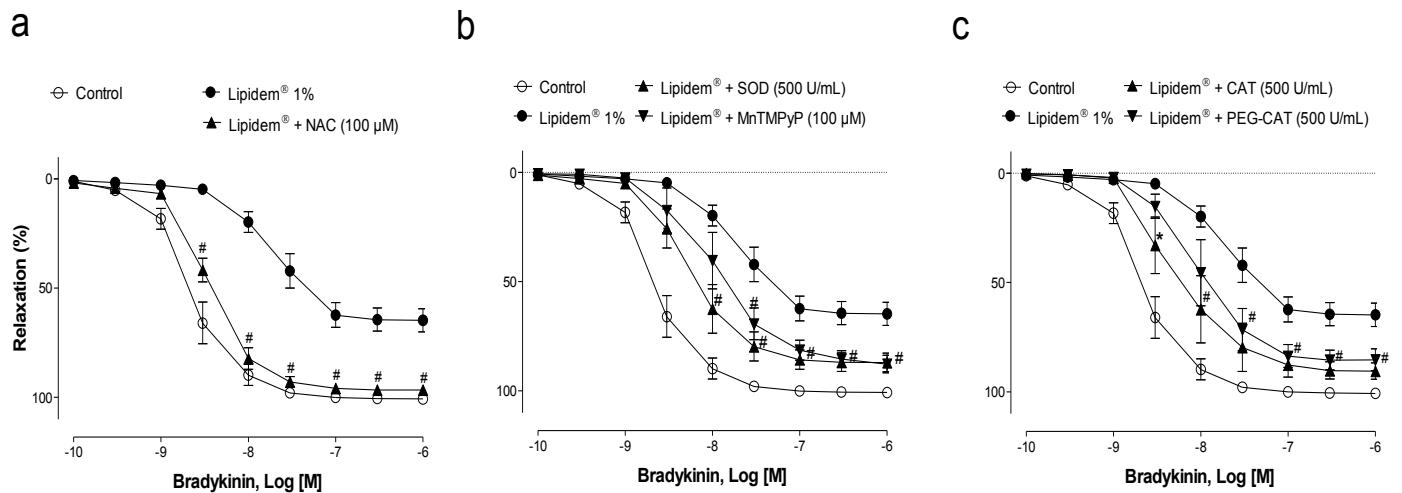


Fig. 4 Role of transition metals in the endothelial dysfunction induced by Lipidem®

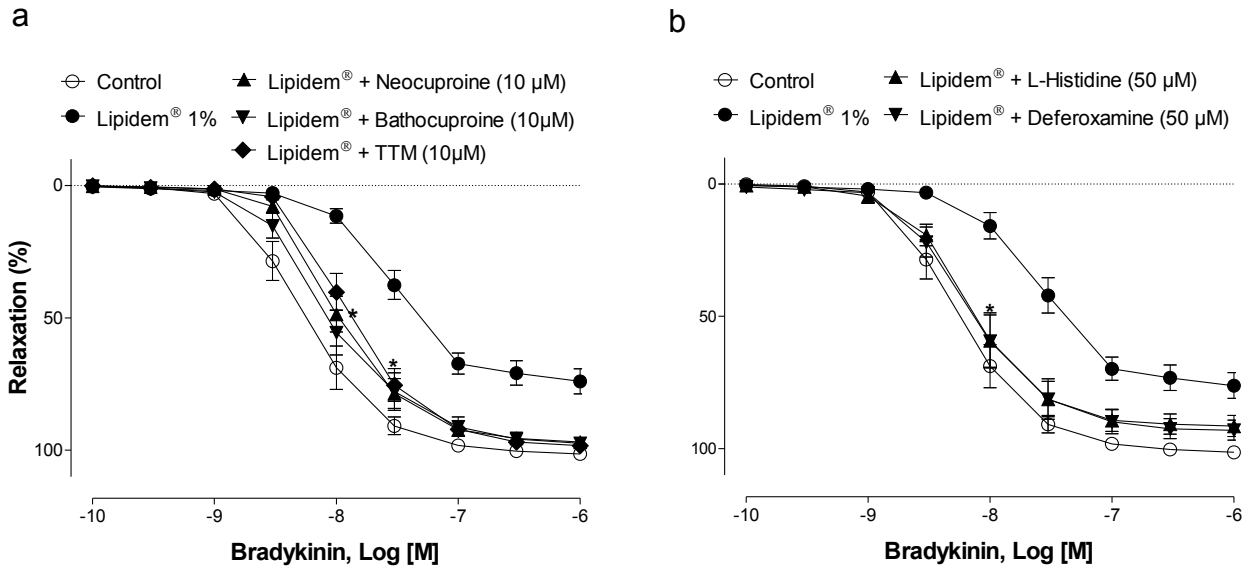


Fig. 5 Lipidem®-induced oxidative stress in coronary artery sections

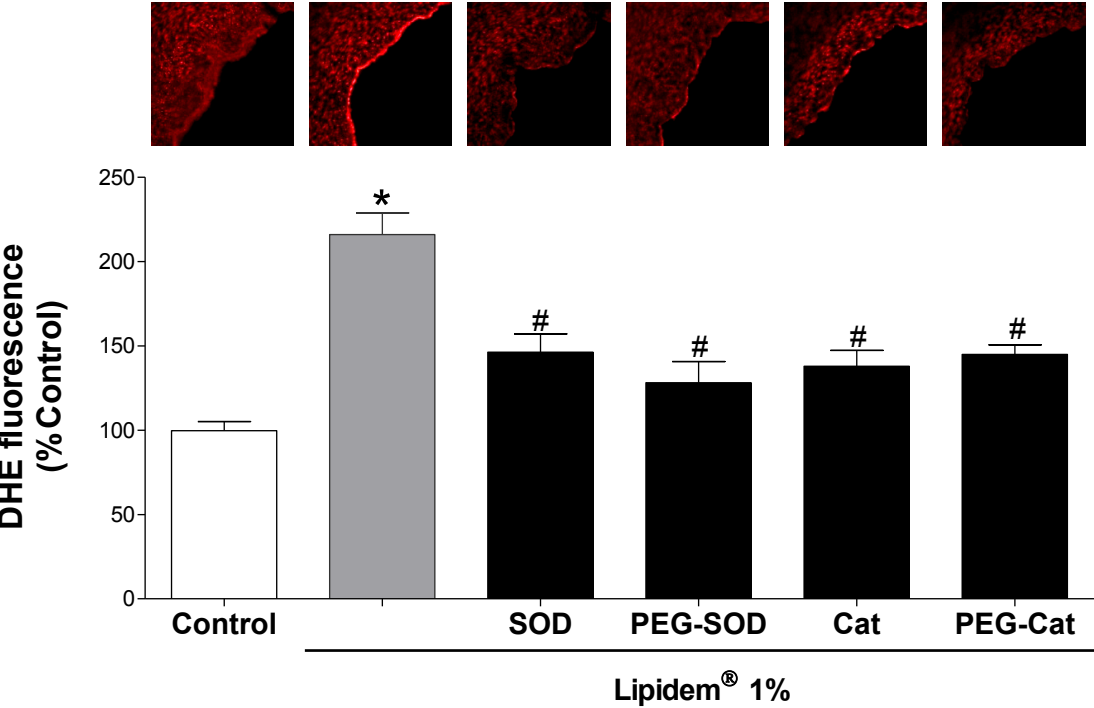


Fig. 6 Role of transition metals in the vascular oxidative stress induced by Lipidem®

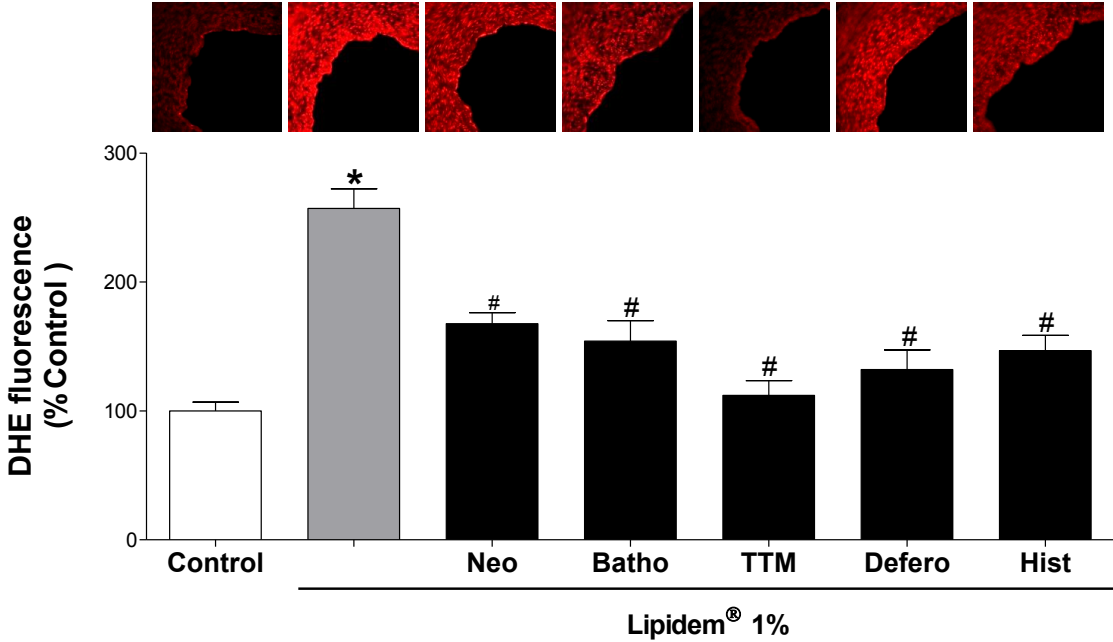
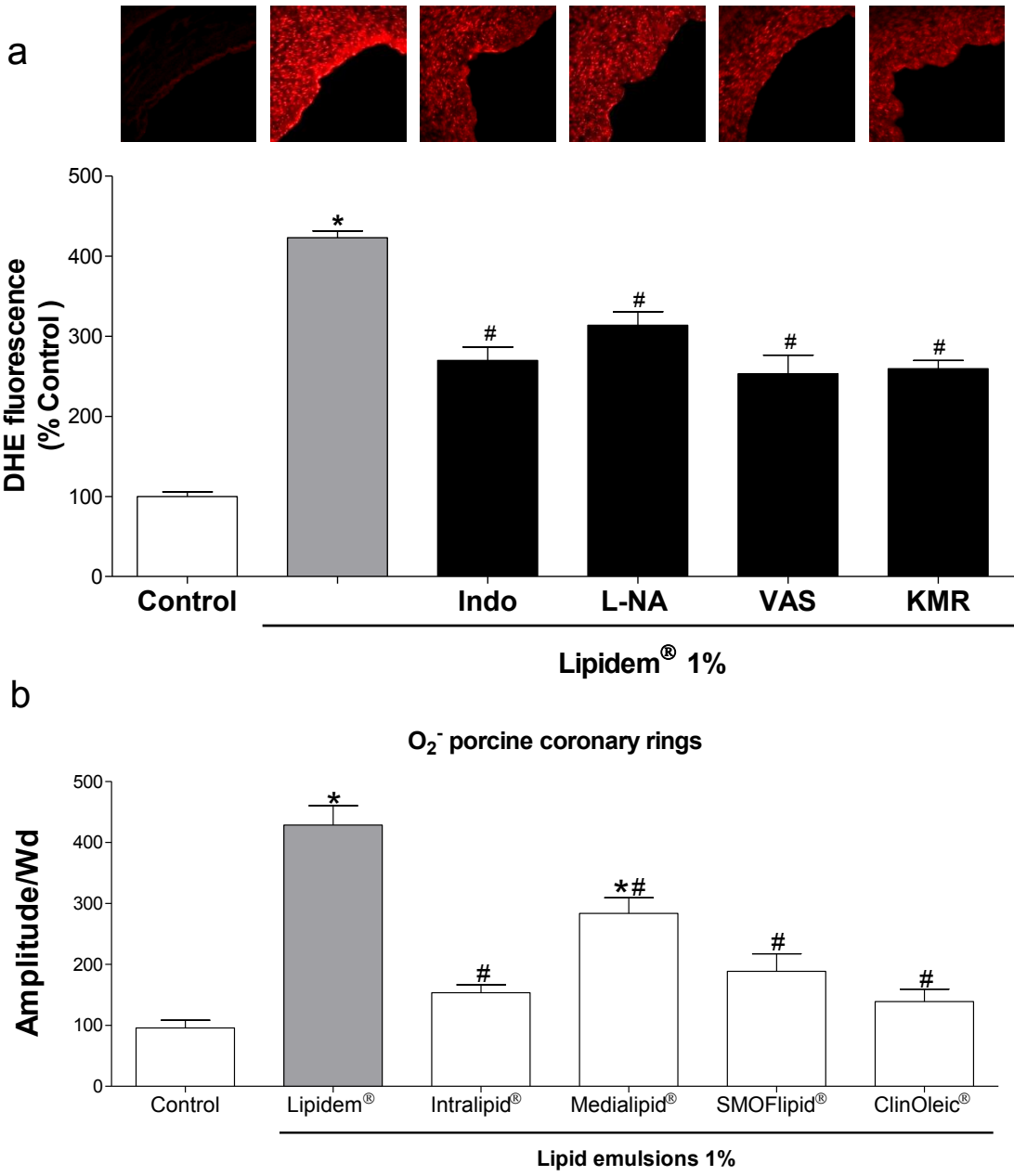


Fig. 7 Role of several sources of oxidative stress in the Lipidem[®]-induced vascular oxidative stress



DISCUSSION GÉNÉRALE

Etude 1

1. Rationnel de l'utilisation de l'EPA:DHA 6:1

Dans cette étude, nous avons montré les effets potentiels de la formulation EPA:DHA 6:1 d'oméga-3 utilisée pour la première fois dans un modèle animal d'hypertension pulmonaire modérément évolutive. En effet, de nombreuses études épidémiologiques, fondamentales et cliniques indiquent que les acides gras de la série oméga-3 (EPA, DHA) jouent un rôle important dans la prévention et le traitement de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, le syndrome métabolique et l'hypertension artérielle (Auger et al., 2016; Kromhout et al., 2012; Shimokawa et al., 1988). Ces effets bénéfiques sont en grande partie expliqués par leurs potentiels vasodilatateurs directement liés à des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Cottin et al., 2011).

Les travaux précédemment menés dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence la supériorité de la formulation EPA:DHA 6:1 à induire des relaxations dépendantes de l'endothélium sur des modèles de vaisseaux isolés et à stimuler la production de monoxyde d'azote (NO) au niveau des cellules endothéliales en culture (Zgheel et al., 2014). Très peu d'études se sont intéressées à l'intérêt de l'EPA et le DHA dans la circulation pulmonaire.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à montrer la capacité de la formulation optimisée EPA:DHA 6:1 à prévenir l'hypertension pulmonaire dans un modèle expérimental chez le rat. Nous avons étudié la physiopathologie de l'HTAP induite par l'injection de MCT, associée à la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire pulmonaire, l'inflammation et le stress oxydant vasculaire pulmonaire.

2. Le choix du modèle d'HTAP induit par la MCT chez le rat

Le modèle de rat-monocrotaline est souvent utilisé pour l'étude des modifications fonctionnelles et structurales de l'artère pulmonaire associées à l'hypertrophie et l'insuffisance du VD. La MCT induit une HTAP sévère au bout de 3 à 4 semaines, caractérisée d'une lésion vasculaire pulmonaire suivie d'une hypertrophie de la média, une infiltration inflammatoire de l'adventice, une fibrose intimale des artères pulmonaires et une

augmentation des RVP aboutissant à une dilatation et à une insuffisance cardiaque droite en quelques semaines (Dumitrascu et al., 2011; Ryan et al., 2011). Les mécanismes toxicologiques parmi lesquels la MCT initie les anomalies pulmonaires ne sont pas encore totalement élucidés. Néanmoins, les phénomènes liés à son ingestion ont permis de faire évoluer les recherches sur l'HTAP, sachant qu'elle induit une inflammation sévère du tissu pulmonaire (Henriques-Coelho et al., 2008). La MCT est un alcaloïde pyrrolizidinique macrocyclique, métabolisée dans le foie par le cytochrome P450 (CYP450) en sa forme active, la monocrotaline-pyrrole. Ce dernier circule jusqu'au poumon où elle induit des lésions et de la fibrose vasculaire pulmonaire associées à une activation des réponses inflammatoires et du stress oxydant (Schultze et al., 1998; Wilson et al., 1989). Au niveau du cœur, il s'ensuit une hypertrophie du VD (Nogueira-Ferreira et al., 2016). Toute molécule capable d'inhiber le CYP450 (CYP3A4) peut bloquer la formation de monocrotaline-pyrrole dans le foie et donc limiter ses effets au niveau du poumon. Ce type de blocage est écarté dans notre modèle de traitement préventif à l'oméga-3 car il a été démontré dans un modèle d'HTAP induite par l'hypoxie chronique, que le DHA prévient l'augmentation de la pression systolique du VD et inhibe le remodelage des artérioles pulmonaires (Yan et al., 2013). Les dérivés d'oméga-3 n'ont pas montré dans la littérature de blocage du CYP450 ou une inhibition de la formation du métabolite actif de la monocrotaline-pyrrole avant même qu'ils n'arrivent au poumon pour induire la maladie. D'ailleurs, la superfamille des CYP450 sont impliqués dans la biosynthèse des oméga-3 et leurs effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire (Westphal et al., 2015). L'HTAP induite par l'injection de MCT ressemble à la forme humaine par sa gravité hémodynamique, anatomo-pathologique et sa mortalité naturelle particulièrement élevée (Schultze et al., 1998 Wilson et al., 1989). Nous avons donc choisi ce modèle dans notre étude pour sa bonne reproductibilité, son coût faible et la rapidité de son évolution. Les mécanismes impliqués dans le développement de l'HTAP induite par l'injection de MCT ne sont pas totalement identifiés. Cependant, la dysfonction endothéliale, le stress oxydant et l'inflammation restent toujours des éléments clés impliqués dans la pathogène de l'HTAP.

3. EPA:DHA 6:1 prévient les modifications des paramètres hémodynamiques

Dans notre étude, nous avons montré qu'après 21 jours suivant l'injection de MCT, les rats du groupe MCT présentent une hypertension pulmonaire, qui se traduit par une forte augmentation de la PAPm allant de 16 mmHg chez les rats du groupe contrôle à 38 mmHg pour les rats sous MCT, mesurée par cathétérisme cardiaque droit. Ceci est corrélé à une

augmentation significative de la pression systolique du VD et une diminution du débit cardiaque. Par contre, il n'y a aucun effet de l'injection de MCT sur la circulation systémique comme le montre les résultats sur la fréquence cardiaque, la pression artérielle moyenne et la fraction d'éjection du VG. Nous sommes donc dans un modèle d'insuffisance du VD et que la MCT est sans effet sur le cœur gauche. Le traitement des rats MCT avec l'EPA:DHA 6:1 a prévenu significativement l'élévation des pressions pulmonaires ainsi que la diminution du débit cardiaque.

4. EPA:DHA 6:1 prévient le remodelage ventriculaire droit

Le remodelage du VD est évalué en Doppler cardiaque et en histologie. Les paramètres échographiques mesurés 3 semaines après injection de MCT montraient chez les rats une dilatation significative du VD caractérisée par l'augmentation de surface et le diamètre cavitaire du VD en télé-diastolique par rapport aux rats du groupe contrôle. La dilatation du VD est associée à une diminution significative de la fraction de raccourcissement en surface du VD affirmant ainsi un dysfonctionnement de ce dernier. Nous avons évalué l'hypertrophie du VD par la majoration de l'index cardiaque appelé également *indice de Fulton* calculé suivant le rapport du poids du VD sur la somme du poids du VG + S. Les rats MCT présentent une augmentation significative de l'indice de Fulton qui s'élève de 0,22 chez les rats du groupe contrôle à 0,56 pour les rats sous MCT. Cette hypertrophie du VD est confirmée par l'augmentation de l'index cardiaque calculé suivant le rapport du poids du VD sur le poids corporel du rat. Les analyses d'histologies révèlent que l'injection de MCT induit une forte hypertrophie des cardiomyocytes au niveau du VD caractérisée par une augmentation significative des surfaces de ces cardiomyocytes comparés aux rats contrôles. La dilatation significative du VD dans le groupe des rats MCT entraînait une modification des paramètres morphologiques du VG avec une diminution du diamètre cavitaire gauche à cause de l'interaction bi-ventriculaire, sans pour autant modifier son fonctionnement. Par contre, il n'y a aucune répercussion de l'injection de MCT sur les cardiomyocytes du VG, confirmant ainsi que la MCT est sans effet sur le cœur gauche.

L'EPA:DHA 6:1 a un effet bénéfique sur l'hémodynamique du cœur droit en prévenant l'augmentation de la pression systolique du VD et protège le cœur des altérations fonctionnelles et structurales induites par la MCT en prévenant la dilatation et l'hypertrophie du cœur droit et la diminution du FAC. Ce modèle de rat MCT a été validé sur une étude récente caractérisée par une hypertrophie du VD (Imoto et al., 2016; Lambert et al., 2015). Il a été montré que le traitement à l'oméga-3 prévient significativement l'hypertrophie cardiaque droite,

quantifiée par la majoration de l'indice de Fulton, couramment utilisé pour confirmer la sévérité d'HTAP expérimentale (Mam et al., 2010; Tual et al., 2006).

5. EPA:DHA 6:1 prévient le remodelage de l'artère pulmonaire

Le remodelage de l'artère pulmonaire principale est évalué en Doppler pulsé par la mesure des diamètres et du flux d'éjection pulmonaire. Les rats MCT présentent une hypertrophie pariétale de l'artère pulmonaire associée à une augmentation plus importante de son diamètre télé-diastolique. L'aspect de l'enveloppe du flux pulmonaire est caractérisé par un épaulement et une diminution significative du temps d'accélération de l'artère pulmonaire témoignant d'une hypertension pulmonaire pulsative associée à l'augmentation des RVP estimés par le rapport de la vélocité de l'insuffisance tricuspидienne sur l'intégrale temps vitesse (ITV) sous flux pulmonaire. Nous avons évalué le remodelage des artérioles pulmonaires en histologie et immunohistochimie. Les rats MCT présentent une forte hypertrophie de la média des artérioles pulmonaires avec une obstruction nette de la lumière artériolaire. Cette hypertrophie de la média est plus prononcée sur les plus petites artères pulmonaires de diamètre inférieur à 50 μm . Ce remodelage artériolaire pulmonaire est marqué par un début de la fibrose et une forte muscularisation de la paroi artériolaire détectée par l'alpha actine.

Les résultats obtenus par échocardiographie montrent que le traitement avec EPA:DHA 6:1 empêche les changements morphologiques au niveau de l'artère pulmonaire tels que l'aspect d'épaulement au niveau du flux d'éjection pulmonaire, la diminution du temps d'accélération (PATT) et rétablit les RVP. Les analyses histologiques de coupes de poumons de rats MCT montrent que EPA:DHA 6:1 prévient l'obstruction des artères pulmonaires en empêchant fortement l'hypertrophie de la paroi des artérioles. Le traitement avec EPA:DHA 6:1 a réduit la muscularisation de la paroi des petites artérioles pulmonaires inférieure à 50 μm de diamètre.

6. EPA:DHA 6:1 prévient les réponses inflammatoires induites par la MCT

L'inflammation et la réponse immunitaire jouent un rôle déterminant dans l'initiation des altérations morphologiques et fonctionnelles de l'artère pulmonaire dans l'HTAP (Wrigley et al., 2011). En effet, des infiltrats composés de cellules inflammatoires mononuclées (macrophages, lymphocytes T et B et cellules dendritiques) ont été mis en évidence autour des lésions vasculaires pulmonaires dans l'HTAP humaine et expérimentale

(Huertas et al., 2014; Voelkel et al., 1998). Il a été démontré dans le modèle d'HTAP induite par la MCT chez le rat, une activation des réponses inflammatoires associées aux remodelages vasculaires sévères qui caractérisent la maladie (Li et al., 2016).

Nous avons mis en évidence le rôle de l'inflammation dans le remodelage des artérioles pulmonaires en immunohistochimie. Les résultats montrent que le remodelage des artérioles pulmonaires est marqué par une forte infiltration en périvasculaire et dans les cloisons alvéolaires de macrophages détectés par le CD68 [ED-1] et une infiltration de lymphocyte T détectée par le CD3. Nous avons également montré que l'hypertrophie des cardiomyocytes du VD est accompagnée d'une infiltration significative de macrophages. Le traitement à l'oméga-3 prévient significativement les infiltrations de macrophages et de lymphocytes. Nos résultats suggèrent que l'oméga-3 via l'inhibition de l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T, contribue probablement à protéger le système artériel pulmonaire contre les altérations et le remodelage vasculaires à l'origine de l'HTAP et de l'athéro-thrombogénèse induits par la MCT. Les mécanismes par lesquels les oméga-3 altèrent les réponses inflammatoires ne sont pas clairement établis dans cette étude. En fait, il a été montré que l'EPA et le DHA s'incorporent dans les phospholipides des membranes plasmiques cellulaires et entrent en compétition avec le métabolisme de l'AA au niveau enzymatique (COX et LOX) et donnent des métabolites eicosanoïdes anti-inflammatoires (Lorente-Cebrian et al., 2013). Par ailleurs, il est clairement démontré dans la littérature que les oméga-3 possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Kromhout et al., 2012). Une récente étude menée sur un modèle d'HTAP induite par la MCT, traité avec l'acide docosapentaénoïque (231 mg/kg), un métabolite intermédiaire entre l'EPA et le DHA, confirme le rôle bénéfique de ces composants sur la réponse inflammatoire au niveau du remodelage artériolaire pulmonaire. Ces travaux ont mis en évidence une diminution de l'activation de NF- κ B et de la p38 MAPK, conduisant à une réduction des métalloprotéinases MMP2 et MMP9 (Morin et al., 2014). Des données récentes ont par ailleurs montré que les oméga-3 pouvaient également exercer leur effets anti-inflammatoires par l'intermédiaire de médiateurs lipidiques dont ils sont les précurseurs tels que la résolvine E1 (dérivé de l'EPA) et la protectine D1 (dérivé du DHA) (Hiram et al., 2014; Schwab et al., 2007; Serhan et al., 2008). Les effets bénéfiques de la formulation EPA:DHA 6:1 pourraient découler de leurs propriétés anti-inflammatoires (Morin et al., 2014) montrant que l'acide docosapentaénoïque monoacylglycérade (MAG-DPA) réduit l'inflammation et le remodelage artériolaire pulmonaire dans l'HTAP expérimentale induite par la MCT (Morin et al., 2014). L'EPA et DHA incorporés dans la membrane cellulaire, inhibent la production des cytokines pro-

inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α) et la migration des cellules inflammatoires participant ainsi au contrôle endogène de l'inflammation remplaçant les acides gras polyinsaturés n-6 (AA) comme substrat pour la synthèse des métabolites pro-inflammatoires (Bannenberg et al., 2005).

7. EPA:DHA 6:1 prévient le stress oxydant induit par la MCT

Par ailleurs, nous avons vu dans la partie introduction de ce mémoire qu'il existe un lien étroit entre l'inflammation, le stress oxydant et le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP. (Crosswhite et al., 2010). Le stress oxydant est impliqué dans la pathogénèse de la dysfonction circulatoire et la défaillance cardiaque, notamment par le biais d'une amplification potentielle des réponses pro-inflammatoires conduisant ainsi à un remodelage intense des artères pulmonaires (Dorfmueller et al., 2011). Nous avons montré au niveau des sections de poumons de rats traités à la MCT en utilisant la sonde fluorescente dihydroéthidium, une augmentation de la formation *in situ* des ROS. La caractérisation du stress oxydant implique de nombreuses voies enzymatiques notamment la NADPH oxydase, des cyclooxygénases, la eNOS découplée et la chaîne respiratoire mitochondriale comme sources majeures des ROS. La production accrue des ROS par la NADPH oxydase et une augmentation de l'expression de diverses sous-unités de la NADPH-oxydase (p22^{phox}, nox1, nox2) a été identifiée dans les artérioles pulmonaires issues de rats traités à la MCT et initie le phénomène de découplage de la eNOS (Barman et al., 2014). Nous avons confirmé la forte production de l'anion superoxyde sur des segments de poumons de rats MCT par la technique de résonance paramagnétique électronique en utilisant le CMH de la famille d'hydroxylamine, un piègeur de spin. Le traitement à l'oméga-3 a prévenu la forte production des ROS. Les résultats confirment la production accrue du NO radicalaire et de l'anion superoxyde sur les segments de poumons de rats du groupe MCT et permet de mieux comprendre l'implication du stress oxydant dans la pathogénèse de l'HTAP induite par la MCT. Nous avons effectivement mis en évidence par immunofluorescence, une augmentation du niveau d'expression des sous-unités transmembranaires de la NADPH oxydase (p22^{phox} et p47^{phox}), des cyclooxygénases, et de l'eNOS découplée sur des sections de poumons de rats traités à la MCT. Nos résultats démontrent que la formulation optimisée EPA:DHA 6:1 prévient le stress oxydant et la surexpression des protéines telles que les sous-unités de la NADPH oxydase (p22^{phox} et p47^{phox}), des cyclooxygénases, la eNOS découplée médiés dans l'activation du stress oxydant vasculaire. Compte tenu du rôle du stress oxydant vasculaire dans le remodelage pulmonaire et la dysfonction ventriculaire droite, les effets bénéfiques de

la formulation EPA:DHA 6:1 pourraient aussi découler de leurs propriétés antioxydantes. Il a été montré dans la littérature que l'EPA et le DHA peuvent potentiellement influencer les marqueurs de l'inflammation (IL-1, IL-6, TNF α) et le stress oxydant liés à l'hypertension artérielle chez le rat SHR (Molinar-Toribio et al., 2015). Une étude récente a montré sur des artères pulmonaires humaines (APH) cultivé *in vitro* que la RvD1, un métabolite actif du DHA, prévient significativement l'hyperréactivité des APH induite par les réponses pro-inflammatoires au TNF α et l'IL-6 (Hiram et al., 2015).

8. EPA:DHA 6:1 prévient la surexpression des récepteurs de l'ET-1

On sait que l'ET-1 est pro-inflammatoire et pro-oxydant (Schiffirin et al. 2010). Plusieurs études ont démontré que l'ET-1 est un acteur majeur de la pathogénèse de l'HTAP (Eddahibi et al., 2001). L'ET-1 est puissant vasoconstricteur sécrété en conditions normales par les CE (Stewart et al., 1991). Il a été observé chez les patients atteints d'HTAP, une augmentation de la synthèse d'endothéline-1 par les cellules endothéliales. Le niveau de la surproduction d'ET-1 est corrélé avec la gravité de la maladie. L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur des CML, possédant également des propriétés mitogènes et hypertrophiques. Il aggrave l'inflammation vasculaire pulmonaire en augmentant la perméabilité membranaire, l'adhésion cellulaire ainsi que la production de cytokine pro-inflammatoire. Elle active les voies de signalisations intracellulaires impliquées dans l'augmentation de la contraction (Agapitov et al., 2002). Il s'ensuit une vasoconstriction soutenue des artères pulmonaires et une activation de la prolifération menant au remodelage artériel (Giaid et al., 1993). Certains traitements comme le Bosentan, un antagoniste mixte des récepteurs ET_A et ET_B de l'ET-1, sont susceptibles d'inhiber le remodelage des petites artères pulmonaires induit par l'ET-1 chez les rats traités à la MCT (Rubin et al., 2002). Une étude récente a montré sur des études de la réactivité vasculaire réalisée sur des anneaux d'artère pulmonaire humaine que la résolvine et le MAG-DHA prévient significativement la vasoconstriction induite par l'ET-1 en réponse à l'analogue du thromboxane, le U46619 (Hiram et al., 2015). Nous avons testé l'implication de l'ET-1 dans notre modèle d'HTAP par immunofluorescence à travers l'expression de son récepteur ET_A et ET_B situé au niveau des CML. Les rats traités à la MCT présentaient une surexpression des récepteurs de l'ET-1 (ET_A et ET_B) au niveau de la media, qui a été significativement prévenu par le traitement à l'EPA:DHA 6:1. Les résultats suggèrent que l'activation du système ET-1 participe à la vasoconstriction, au remodelage artériel pulmonaire et cardiaque droit observé dans l'HTAP induit par l'injection de MCT.

9. EPA:DHA 6:1 prévient la dysfonction endothéliale

Il est aujourd'hui bien établi que la dysfonction endothéliale constitue un élément majeur de la pathogénèse de l'HTAP. La dysfonction endothéliale résulte en un défaut de production de substances vasodilatatrices et antiprolifératives telles que le NO et la PGI₂ et à une surproduction de substances vasoconstrictrices et mitogènes telles que l'ET-1 et le TXA₂, stimulant également la prolifération des CML vasculaires pulmonaires et des fibroblastes ainsi qu'à la thrombose artérielle. Ces anomalies provoquent un remodelage vasculaire pulmonaire (Houtchens et al., 2011). La dysfonction endothéliale est également caractérisée par l'activation des réponses pro-inflammatoires associée au stress oxydant vasculaire exacerbant le remodelage vasculaire pulmonaire (Leopold et al., 2016). Le NO induit une relaxation des CMLV en activant la guanylyl cyclase (GCs), ce qui accroît la concentration intracellulaire du GMPc (guanosine monophosphate cyclique). En accord avec les données rapportées dans la littérature, une altération de la fonction endothéliale de l'artère pulmonaire a été observée sur le groupe des rats MCT. Nous avons montré sur les anneaux d'artère pulmonaire principale des rats exposés à MCT, une diminution significative de la contraction en réponse à la phényléphrine et de la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine. Ce qui indique une induction d'une dysfonction vasculaire pulmonaire par l'injection de MCT.

Le traitement à l'oméga-3 améliore partiellement mais significativement la relaxation dépendante de l'endothélium. Par contre, aucune amélioration n'a été observée sur la réponse contractile des CML. Nous avons caractérisé l'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium en présence et en absence de L-NA, un inhibiteur de la eNOS. Dans les groupes contrôles, en présence de L-NA, la relaxation dépendante de l'endothélium est significativement inhibée. Ce qui indique que la relaxation de l'artère pulmonaire est majoritairement NO-dépendante. L'effet vasodilatateur NO-dépendant contrebalance ou s'oppose à un effet vasoconstricteur. Le NO joue un rôle important dans le contrôle de la synthèse et/ou la sécrétion d'ET-1 (Bode-Boger et al. 1996 ; Quaschnig et al. 2003). Dans les rats des groupes MCT, en présence de L-NA, la relaxation dépendante de l'endothélium est fortement inhibée. Finalement, nous avons constaté une réponse contractile à l'acétylcholine en absence et en présence de L-NA, un phénomène observé dans des nombreuses pathologies comme dans le cas de l'hypertension artérielle systémique induite à l'Angiotensine II chez le rat (Zahid et al., 2016). Ceci est dû à la production des prostanoïdes vasoconstricteurs ou les EDCFs (les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium).

Nous avons montré que la MCT a induit une surproduction des ROS et une surexpression des COX. Ce qui altère la relaxation dépendante du NO de l'artère pulmonaire principale en réponse à l'ACh. L'oméga-3 prévient la diminution de la relaxation dépendante du NO en réponse à l'ACh. Nos résultats soulignent le rôle du stress oxydant sur le découplage de la eNOS, diminuant ainsi la production de NO. Ces premiers résultats suggèrent que la formulation EPA:DHA 6:1 exerce des effets vasoprotecteurs médiés vraisemblablement par une augmentation de la production de NO. Les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale et du remodelage artériole pulmonaire sont en partie liés à des réponses inflammatoires, au stress oxydant et à la libération de facteurs endothéliaux vasoconstricteurs comme l'ET-1, l'angiotensine II ou les prostanoides vasoconstricteurs dérivées de l'acide arachidonique produites par des cyclooxygénases (PGE₂, TXA₂) (Gryglewski et al., 2001; Leopold et al., 2016). De plus, l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T dans la paroi périvasculaire pulmonaire contribue probablement avec l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, à la production des ROS et d'anions superoxydes qui réagissent avec le NO dérivé de l'endothélium, pour en abaisser sa biodisponibilité et contribuer à la dysfonction endothéliale (Touyz et al. 2005). Nous avons montré dans le laboratoire que la formulation EPA:DHA 6:1 diminue l'expression de la NADPH oxydase vasculaire et améliore la voie Akt/eNOS phosphorylée (Zgheer et al., 2014). La formulation EPA:DHA 6:1 probablement *via* les résolvines qui en dérivent, améliorent la dysfonction endothéliale induite par la MCT. Ces résultats confirment ceux d'autres travaux, montrant le rôle des résolvines dérivés de l'EPA et du DHA dans la normalisation de l'hyperréactivité des artères pulmonaires humaines et la résolution de l'inflammation (IL-6, TNF α) pour la prévention de l'HTAP (Hiram et al., 2015).

10. Mode d'action des oméga-3

Dans notre étude, nous avons développé un traitement préventif de l'HTAP induite par la MCT, car le risque de décès est majeur une fois que la pathologie s'est installée. L'EPA:DHA 6:1 prévient l'hypertension pulmonaire et les altérations cardiovasculaires notamment la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire pulmonaire, l'inflammation et le stress oxydatif. Les mécanismes sous-jacents restent à clarifier, nous pouvons suggérer que l'EPA:DHA prévient potentiellement les remodelages artériolaires par une inhibition de la prolifération des CMLV, des réponses inflammatoires et du stress oxydant. C'est pourquoi, une identification des métabolites actifs des oméga-3 est nécessaire pour les travaux futurs. En accord avec d'autres travaux, un effet vasodilatateur et anti-inflammatoire des résolvines

et les protectines a été montré *in vitro* sur des artères pulmonaires humaines (Morin et al., 2009). De nombreux autres métabolites produits indirectement par les oméga-3 comme par exemple, la PGI₃ a un effet vasodilatateur supérieur par rapport à la PGI₂ qui est utilisé en clinique humaine pour traiter l'HTAP (McLaughlin et al., 2009). Les métabolites de l'EPA et du DHA ont des effets vasodilatateurs, anti-inflammatoires, anti-mitogéniques et antiagrégants et réduisent l'hypertension artérielle (Singer et al., 2008). Ces effets vasculaires pourraient activer les canaux potassiques calcium-dépendants et ATP-dépendants soit directement, soit via l'activation de la protéine kinase A (Morin et al., 2009; Revermann et al., 2009). Ces résultats sont en adéquation avec une étude expérimentale sur un modèle de rats atteints d'hypertension pulmonaire chronique qui montre une baisse du taux de mortalité chez les rats hypoxiques, avec une diminution des modifications des paramètres hémodynamiques et morphologiques liées à l'hypoxie chronique (Houeijeh et al., 2011). Nous avons montré dans l'introduction que la formulation EPA:DHA 6:1 entraînent une relaxation des artères coronaires en augmentant la production de substances vasodilatatrices et antiprolifératives le NO et la PGI₂ par une formation de ROS au niveau des cellules endothéliales stimulant la phosphorylation des protéines kinases Src/PI-3K/Akt et DAG /PKC menant à l'activation de la eNOS. Nos prochains travaux devraient confirmer ces hypothèses et s'intéresser également au rôle que pourraient avoir les oméga-3 sur la voie ERK/MAPK impliquée dans la prolifération des CMLV et à leur capacité à activer les canaux potassiques voltage-dépendants et les canaux potassium dépendants du calcium participant à la vasoconstriction et au remodelage vasculaire pulmonaire.

11. la pertinence des oméga-3 chez l'Homme

Le bénéfice apporté par le traitement EPA:DHA 6:1 est suffisamment important et concerne la prévention de l'HTAP expérimental chez le rat, la dysfonction endothéliale et le remodelage cardio-pulmonaire, l'inflammation et le stress oxydant. Un certain nombre de données obtenues chez l'homme ou sur un modèle animal s'accordent à décrire les potentialités de l'EPA et du DHA à prévenir le remodelage vasculaire (Zanetti et al., 2015), la dysfonction endothéliale (Auger et al., 2016), l'inflammation chronique (Morin et al., 2013) et le stress oxydant (Herrera et al., 2015) associés aux pathologies cardiovasculaires et à l'HTAP. L'oméga-3 (EPA, DHA) a été prouvé dans la littérature dans des nombreuses études cliniques à réduire la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires. Les effets bénéfiques des oméga-3 sur la santé sont attribués à leur capacité à corriger le syndrome métabolique (hypertriglycéridémie, l'hypercholestérolémie et l'obésité), à réduire le risque de

développement de la plaque d'athérome et les accidents vasculaires cérébraux associés, à diminuer les arythmies cardiaques et les risques de survenu d'infarctus du myocarde (Cottin et al., 2011; Kromhout et al., 2012). La consommation régulière d'EPA et DHA est corrélée à une amélioration des paramètres hémodynamiques, la protection de la fonction endothéliale, une diminution des réponses pro-inflammatoires et l'agrégation plaquettaire (Abeywardena and Head, 2001; Cottin et al., 2011; Kromhout et al., 2012).

Nous allons citer quelques exemples sur le rationnel de l'utilisation des oméga-3 en tant que médicament. L'Omacor[®], une formulation d'oméga-3 contenant un rapport EPA:DHA 1,2:1, est un médicament qui a une AMM aux Etats-Unis dans le traitement des hypertriglycémies endogènes et le traitement post-infarctus afin de réduire le risque d'athéromatose en prévention secondaire (Kar et al., 2014; Yusof et al., 2013). Nous avons également le Vascazen[®] du laboratoire Pivotal Therapeutics, une formulation déposée d'EPA et de DHA proche du ratio 6:1 destinée à compenser un déficit en oméga-3 chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires. Le Vascazen[®] est commercialisé aux Etats-Unis en traitement adjuvant pour compenser un déficit en oméga-3 chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires. Cette formulation a montré une activité protectrice sur la fonction endothéliale bien supérieure à celle de la formulation EPA:DHA 1:1 proche à celle de l'Omacor[®] (Zgheer et al., 2014). Les propriétés cardiovasculaires des oméga-3 résulteraient de leur capacité à réguler, via leurs métabolites oxygénés bioactifs (les eicosanoïdes), l'expression des gènes codant pour des enzymes du métabolisme énergétique (lipogenèse, glycolyse), les médiateurs de l'inflammation (gènes codant pour les adipokines et cytokines), ainsi que pour les gènes codant pour les molécules d'adhésion (Calder et al., 2013). L'EPA et le DHA réduisent les gènes codant pour les interleukines (IL-1, IL-6, IL-8), les molécules d'adhérence cellulaire (VCAM-1, ICAM-1) et les molécules d'adhésion endothéliale (sélectine-E) (Clarke et al., 1993; De Caterina et al., 1994; Tagawa et al., 1999). La clarification des mécanismes potentiellement impliqués dans le bénéfice de la formulation EPA:DHA 6:1 à prévenir le développement de l'HTAP chez le rat, permettrait dans l'avenir de lui proposer comme traitement adjuvant en prévention secondaire d'HTAP. Parallèlement, en association aux traitements de référence (incluant l'époprosténol, le bosentan, ou le sildénafil) comme le cas de l'Omacor[®] dans le traitement adjuvant en prévention secondaire de l'infarctus du myocarde incluant les statines, les antiagrégants plaquettaires, les bêtabloquants et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

Etude 2

Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser les processus impliqués dans la dysfonction endothéliale induite par les émulsions lipidiques. La nutrition parentérale par les émulsions lipidiques (mélange de TCL/TCM) ne peut plus être considérée comme permettant exclusivement de satisfaire les besoins énergétiques et structuraux d'acides gras essentiels, il s'agit d'envisager les nutriments comme de véritables promoteurs de la santé. Cette réorientation de la recherche en nutrition parentérale a consisté d'une part, à mettre en évidence le rôle délétère de certaines émulsions lipidiques et à préciser les phénomènes physiopathologiques impliqués et d'autre part, à déterminer les qualités des acides gras polyinsaturés potentiellement bénéfiques pour la santé.

Nous avons fait une approche pharmacologique *ex vivo* loin des contextes physiopathologiques observés chez les patients en état d'agression nécessitant une nutrition parentérale. Nous avons comparé les effets des différentes formulations d'émulsions lipidiques utilisées en nutrition parentérale au niveau d'anneaux d'artères coronaires de porc. Nos premiers résultats ont montré que des concentrations croissantes de bradykinine induisent une relaxation maximale dépendante de l'endothélium sur les anneaux contrôles. Nous avons montré que l'incubation d'anneaux d'artères coronaires avec 1 % du Lipidem[®], Medialipide[®], Intralipide[®] et SMOFlipid[®] (mélange de TCL/TCM) pendant 30 min, réduit significativement la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à la bradykinine. Par contre, le ClinOléic à 1 % n'affecte pas la relaxation à la bradykinine. Ensuite, nous avons utilisé le nitroprussiate de sodium (SNP), un donneur exogène de NO, pour tester la sensibilité du muscle lisse au NO. Les résultats n'ont montré aucune différence significative en présence de ces formulations lipidiques. Ces résultats sont en accord avec la littérature, puisque il a été montré qu'une incubation d'anneaux d'artères fémorales de rat pendant 20 min avec Intralipid[®] à 1 % induit une dysfonction endothéliale (Nathanson et al., 2009). De plus, il a été mis en évidence *in vivo* que la perfusion d'Intralipide[®] entraînait une dysfonction endothéliale en réponse au chlorure de méthacholine (Mch) associé à l'augmentation des acides gras circulants (Steinberg et al., 1997).

Nous avons sélectionné le Lipidem[®] pour la suite des travaux de caractérisation parce qu'il a montré une altération de la fonction endothéliale supérieure par rapport aux autres formulations d'émulsions. Nous avons cherché à mettre en évidence son effet délétère sur la réactivité vasculaire d'artère coronaire vis-à-vis de la réponse des différents outils pharmacologiques. Nous avons testé la réponse contractile à la sérotonine sur des anneaux

d'artères coronaires en présence et en l'absence de l'endothélium. Les résultats ne montraient pas de différence significative entre les différentes formulations.

En effet, la bradykinine induit une relaxation dépendante de l'endothélium assurée par la composante NO et EDH. La caractérisation de la dysfonction endothéliale induite par le Lipidem[®] a été réalisée par l'inhibition spécifique de différentes composantes de la relaxation à la bradykinine. Pour mettre en évidence la composante NO, nous avons testé la relaxation à la bradykinine en présence de la combinaison indométacine + charybdotoxine + apamine (deux inhibiteurs des canaux potassiques calcium-dépendants de moyenne conductance IK_{ca} et de faible conductance SK_{ca}). La relaxation maximale à la bradykinine dans les conditions contrôles est diminuée significativement en présence du Lipidem[®]. Ceci montre que la dysfonction endothéliale induite par le Lipidem[®] est liée en partie à une diminution de la composante NO. La composante EDH de la relaxation a été testée en présence de la combinaison indométacine + N^o-nitro-L-arginine (L-NA), un inhibiteur de la NO synthase. La vasodilatation dépendante de l'endothélium à la bradykinine dans les conditions contrôles est diminuée significativement en présence du Lipidem[®]. Nous pouvons en déduire que la dysfonction endothéliale induite par le Lipidem[®] en réponse à la bradykinine est donc liée à une diminution des composantes NO et EDHF de la relaxation endothéliale.

Une autre possibilité, est de déterminer également si les EDCFs (facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium) produits par l'endothélium pourraient contribuer à la dysfonction endothéliale. La plupart des EDCFs dérivent du métabolisme de l'AA par la cyclooxygénase. Et de ce fait, nous avons testé cette hypothèse en prenant l'indométacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase. Les résultats montrent une amélioration significative de la relaxation en présence de Lipidem[®]. Les prostanoïdes vasoconstricteurs sont donc impliqués dans la dysfonction endothéliale induite par le Lipidem[®]. La dysfonction endothéliale induite par les émulsions lipidiques est caractérisée par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium, mais aussi par une augmentation des réponses contractiles dépendantes de l'endothélium.

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence le rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale induite par le Lipidem[®]. Nous avons utilisé la N-acétylcystéine (NAC,) un antioxydant général et les résultats montrent une nette amélioration de la relaxation en présence du Lipidem[®]. Ce résultat positif nous a amené à mettre en évidence la nature des ROS. Nous avons utilisé la superoxyde dismutase (SOD) et MnTMPyP son analogue perméant membranaire permettant de mettre en évidence la présence d'anions

superoxydes. La catalase et son analogue le PEG-catalase perméant membranaire, permettent de mettre en évidence la présence du peroxyde d'hydrogène. Les résultats montrent une amélioration significative de la relaxation à la bradykinine en présence du Lipidem[®]. Le stress oxydant est donc impliqué dans la dysfonction endothéliale induite par le Lipidem[®]. Il a été montré dans la littérature que l'augmentation des acides gras circulants induit une dysfonction endothéliale associée à un stress oxydant (Inoguchi et al., 2000; Pereira et al., 2015).

Nous avons également évalué l'implication du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale induite par les émulsions lipidiques, au niveau des sections des artères coronaires et nous nous sommes intéressés à la nature et aux sources enzymatiques vasculaires. Les résultats montrent une forte production des espèces réactives de l'oxygène impliquant plusieurs sources enzymatiques telles que les COXs, NADPH oxydase, la eNOS découplée et la chaîne mitochondriale. La dysfonction endothéliale induite par le Lipidem[®] est donc caractérisée par une inhibition des composantes de relaxation (EDHF+NO), attribuée à une production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant entrainant ainsi la baisse de la biodisponibilité du NO par le découpage de la eNOS suite à l'oxydation du BH₄, son cofacteur principal.

L'effet de l'administration d'émulsions lipidiques sur les paramètres hémodynamiques et la fonction endothéliale chez l'animal entier (choc septique) est présenté dans l'article 3 en annexe. La poursuite de ce travail consistera à déterminer si l'ajout d'acides oméga-3 (proportion, rapport EPA/DHA) permet de réduire l'altération de la fonction endothéliale et de la formation endothéliale de NO induite par les émulsions lipidiques (cellules endothéliales en culture, vaisseaux sanguins isolés, animal entier).

En effet, l'optimisation de la composition des nutriments parentéraux en émulsions lipidiques constitue ainsi un enjeu majeur, afin de moduler la réponse inflammatoire chez les patients critiques, à travers des modifications complexes de la composition et de la structure de la membrane cellulaire et des récepteurs, de la synthèse d'eicosanoïdes, de cytokines et de l'expression de gènes (Calder et al., 2011). En réanimation, principalement chez les patients présentant un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), la supplémentation par des émulsions lipidiques augmenterait la mortalité et le taux de complications notamment pulmonaires (Heyland et al., 1998), en rapport avec des niveaux élevés d'acides gras n-6 acides gras dans les émulsions (Lekka et al., 2004). Cependant, l'huile de poisson pourrait avoir des effets bénéfiques chez les patients septiques (Boisrame-Helms et al., 2015; Calder, 2003). Pour réduire les effets délétères de l'apport de doses élevées d'acides gras n-6, tout en

remplaçant la source énergétique glucidique par des lipides, des émulsions à base de mélanges d'acides gras, notamment à base de TCM ou d'acides gras mono-insaturés (huile d'olive), ont été administrées (Goulet et al., 2010; Waitzberg et al., 2006). Les récents résultats du laboratoire et celles de la littérature ont montré que les acides gras polyinsaturés (oméga-3) améliore la fonction endothéliale et augmente la formation de vasoprotecteurs (NO et EDH) (Auger et al., 2016; Shimokawa et al., 1988; Zgheel et al., 2014). De ce fait, il est vraisemblable que la présence d'acides oméga-3 EPA, DHA dans les émulsions lipidiques pourrait non seulement permettre un apport énergétique, mais aussi protéger la fonction endothéliale du patient sous nutrition parentérale.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'HTAP reste une pathologie fatale engageant le pronostic vital. Les traitements actuels ne permettent pas de guérir cette maladie grave, en dehors de la transplantation cardio-pulmonaire. Dans l'ensemble, les résultats présentés dans ce mémoire permettent de proposer pour la première fois, le potentiel de la formulation EPA:DHA 6:1 à prévenir le développement de l'HTAP expérimentale avec comme cible prioritaire l'inflammation et le stress oxydant. La MCT induit une HTAP associé à un stress oxydant très prononcé dans les petites artères pulmonaires. Ce stress oxydant implique une surexpression de la NADPH oxydase, des COX et de la eNOS découplée, et provoque une dysfonction vasculaire pulmonaire et un remodelage intense des petites artères pulmonaires associé à l'activation des réponses inflammatoire. L'ensemble de ces modifications conduit à une augmentation des RVP aboutissant à une dysfonction et le remodelage du VD. Le traitement chronique des rats MCT avec la formulation EPA:DHA 6:1 a prévenu le développement de l'HTAP et les répercussions structurales et fonctionnelles des petites artères pulmonaire, sur les réponses inflammatoires, ainsi que les répercussions sur le cœur droit induites par l'injection de MCT. Le rapport EPA:DHA 6:1 a un effet remarquable sur la santé en générant un environnement antioxydant par la production des ecosanoïdes anti-inflammatoires, vasodilatateurs, anti-mitogéniques et anti-thrombotiques.

Le mécanisme d'action des oméga-3 n'a pas été totalement élucidé dans cette étude. Il semble que l'EPA:DHA 6:1 par l'intermédiaire de ses métabolites comme la lipoxine, la résolvine, et la protéctine pourraient agir sur une molécule ou une voie de signalisation qui se trouverait en amont des phénomènes de stress oxydant, d'inflammation, de vasoconstriction et de remodelage. Sa modulation pourrait ainsi être un paramètre à contrôler le maintien de l'homéostasie des artères pulmonaires. La littérature fait état de molécules telles que Src/PI3-k/Akt (Zgheer et al., 2014), Akt/mTOR (Ogawa et al., 2013) et ERK/MAPK (Balanza-Martinez et al., 2011) qui pourraient être de bons candidats à rechercher du fait du large panel de voies de signalisation qu'ils proposent. En conclusion, la formulation d'oméga-3 EPA:DHA 6:1 possèdent des effets vasoprotecteurs *in vitro* et *in vivo* en prévenant la dysfonction endothéliale associée à l'HTAP. Ces résultats doivent être pris en compte dans le cadre d'une prise en charge du patient HTAP en prévention.

LES LIMITES

Cette étude présente bien évidemment des limites. Les travaux futurs devraient s'intéresser à l'imprégnation tissulaire d'oméga-3, à l'identification des métabolites actifs responsables des effets bénéfiques observés et à la clarification de modes d'action cellulaires et moléculaires des oméga-3 afin d'identifier les cibles thérapeutiques potentielles pour les systèmes cardiovasculaires et de limiter les conséquences de l'insuffisance cardiaque.

La poursuite de ces travaux nécessitera de mettre en évidence les voies de signalisation intracellulaire des oméga-3, il serait donc important de :

- Confirmer les résultats obtenus dans notre modèle expérimental d'HTAP induite par l'injection de la MCT sur un autre modèle animal d'hypertension pulmonaire comme dans le cas de l'hypoxie chronique et d'en développer plus largement les effets bénéfiques du traitement sur les réponses inflammatoires et du stress oxydant ;
- Evaluer dans un deuxième temps un traitement curatif sur un modèle d'HTAP comme l'hypoxie chronique, moins drastique que le modèle d'HTAP à la MCT ;
- Examiner *in vitro* la capacité de cette formulation EPA:DHA 6:1 sur des artères distales pulmonaires de patients HTAP ;
- Réaliser des études de longue durée sur une population plus large d'HTAP induite à la MCT pour vérifier si les doses modérées d'oméga-3 s'accompagnent de bénéfices cliniques avec une diminution de la mortalité naturelle des animaux ;
- Vérifier l'effet spécifique de l'EPA et du DHA sur l'inflammation et la fonction endothéliale chez des patients HTAP ;
- Comprendre les mécanismes de prévention que pourrait exercer EPA:DHA 6:1 et ses dérivés sur les lésions plexiformes qui sont absentes dans notre modèle d'HTAP induite par la MCT.

Clarifier ces points nous aidera à mieux comprendre les facteurs et les mécanismes potentiellement impliqués dans le bénéfice de la formulation EPA:DHA 6:1 à prévenir le développement de l'HTAP chez le rat. La suite de ce travail nécessitera également d'évaluer le potentiel de l'EPA:DHA 6:1 dans un traitement curatif de HTAP et s'intéresser à des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles comme le large panel de l'inflammation, la prolifération cellulaire induite par l'ET-1 et les facteurs de croissance, la fibrose pulmonaire, l'angiogenèse, l'apoptose, la thrombose et l'ischémie, et exercer ses effets directs sur l'insuffisance cardiaque droite.

Le passage à l'homme devraient déterminer si le traitement à l'EPA:DHA 6:1 peut inverser ou retarder la progression de l'HTAP, potentialiser les effets des traitements actuels, exercer des effets cardioprotecteurs directs afin de limiter les conséquences de l'insuffisance cardiaque responsable de la grande mortalité des patients atteints d'HTAP.

ANNEXES

Article 3

Les triglycérides à chaîne moyenne exacerbent la péritonite dans un modèle de choc septique *in vivo* chez le rat : Rôle de remodelage de la membrane cellulaire.

Medium-Chain Triglycerides Supplementation Exacerbates Peritonitis-Induced Septic Shock in Rats: Role on Cell Membrane Remodeling.

Boisramé-Helms J.*, Said A*, Burban M, Delabranche X., Stiel L., Zobairi F., Hasselmann M., Schini-Kerth V.B., Toti F., Meziani F.

Short title: Lipid emulsions modulate peritonitis-induced shock

Nous avons évalué *in vivo* l'effet de deux de ces émulsions lipidiques dans un modèle de choc septique par péritonite (ligature et perforation caecale) chez le rat, pour déterminer la place de la modulation de la vésiculation membranaire et de l'inflammation dans un système intégré. Cette partie est l'objet d'un deuxième article.

Des rats ayant subi une péritonite par ligature et perforation caecale étaient nourris pendant les 22h suivant l'opération par une émulsion lipidique de nutrition parentérale à l'aide d'un cathéter veineux central avec une jugulaire interne tunnelisé. Une fois le choc septique installé (18ème heure), les rats ont été endormis, ventilés et réanimés pendant 4 h (remplissage vasculaire et noradrénaline) afin d'atteindre un objectif de pression artérielle moyenne fixé à 90 mmHg. Après 4 heures, les rats étaient exsanguinés pour isoler les microparticules et les organes prélevés pour différentes analyses réalisées *ex vivo*.

Nous avons montré que les doses de noradrénaline nécessaires pour obtenir les objectifs de pression artérielle moyenne fixés étaient significativement plus importantes chez les rats préalablement nourris avec des émulsions lipidiques à base de triglycérides à chaînes moyennes (TCM), qu'avec les émulsions à base de triglycérides à chaînes longues (TCL) ($1,7 \pm 0,7$ vs. $0,8 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, $p < 0,05$).

Compte-tenu des résultats que nous avons obtenus *in vitro* sur les monocytes en culture, nous avons émis l'hypothèse que ces effets hémodynamiques pourraient notamment passer par une

altération de la génération de MPs par les émulsions lipidiques. Ainsi, nous avons montré que les émulsions à base de TCM, comparées aux TCL, sont responsables d'une augmentation significative de la vésiculation membranaire (MPs totales : $38,6 \pm 5,8$ versus $19,2 \pm 3,0$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$). Les émulsions lipidiques sont également à l'origine d'une modulation qualitative de la vésiculation membranaire, puisque les TCM augmentent significativement les MPs leucocytaires (MPs CD45 : $17,4 \pm 3,5$ versus $6,0 \pm 1,1$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$), plaquettaires (MPs CD61 : $13,9 \pm 2,5$ pour les TCM *versus* $5,4 \pm 1,3$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$) et endothéliales (MPs CD54 : $16,9 \pm 3,6$ *versus* $5,6 \pm 0,8$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$). La génération de ces différents phénotypes de MPs reflète l'activation cellulaire correspondante, leucocytaire, plaquettaire et endothéliale. Enfin, les TCM majorent significativement le stress oxydant cardiaque et vasculaire.

En conclusion, nous avons montré dans ce deuxième travail que les TCM pourraient avoir des effets délétères pro-oxydants au cours du choc septique en majorant la dysfonction hémodynamique. Ces effets pourraient être liés à une activation cellulaire accrue, exprimée par les MPs endothéliales, plaquettaires et leucocytaires.

Medium-Chain Triglycerides Supplementation Exacerbates Peritonitis-Induced Septic Shock in Rats: Role on Cell Membrane Remodeling

Julie Boisramé-Helms^{1,2*}, Amissi Said^{3*}, Mélanie Burban³, Xavier Delabranche¹, Laure Stiel^{1,4}, Fatiha Zobairi⁴, Michel Hasselmann¹, Valérie Schini-Kerth³,
Florence Toti³, Ferhat Meziani^{1,2}

¹Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

²EA 3072, Fédération de Médecine Translationnelle, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg (France)

³Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch (France)

⁴SVTT, EA 7293, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch (France)

*The two first authors contributed equally to this work

Correspondence to:

Ferhat Meziani (MD, PhD)

Service de Réanimation Médicale – Nouvel Hôpital Civil

1, place de l'Hôpital

F-67091 STRASBOURG cedex (France)

Phone: +33 (0) 369 550 434; Fax: +33 (0) 369 551 859

E-mail: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

Funding sources: This work has been supported by the Alsacian Association for Respiratory Failure Help at Home (Association Des Insuffisants Respiratoires Alsace Lorraine, ADIRAL) and the Association for Research Development in Intensive Care (Association pour le Développement de la Recherche En Réanimation, ADRER).

No conflict of interest.

Short title: Lipid emulsions modulate peritonitis-induced shock

Abstract

Background and aims: Lipid emulsions for parenteral nutrition interfere with immunity and may alter the cell plasma membrane and microparticle release, thus modulating their biological effects. Our aim was to evaluate the effect of two lipid emulsions for parenteral nutrition containing either a mixture of long- and medium-chain triglycerides (LCTs and MCTs) or LCTs only, to assess their role on microparticle release and acute inflammation during septic shock in rats.

Methods and results: Septic rats (cecal ligation and puncture) and sham rats were infused with 5% dextrose or a lipid emulsion during 22 hours. After 18 hours, rats were resuscitated during 4 hours and hemodynamic parameters monitored. Circulating microparticles and their phenotype were measured by prothrombinase assay; heart and aorta were collected for western blotting and electron paramagnetic resonance measurements.

No significant effect of lipid emulsions was observed in sham rats. In septic rats, norepinephrine requirements was increased in MCTs/LCTs infused rats compared to 5% dextrose or LCTs alone infused rats (2.7 ± 0.2 vs. 1.9 ± 0.8 and 1.2 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ respectively, $p < 0.05$) and procoagulant microparticle generation (38.6 ± 5.8 vs. 18.8 ± 3.1 and 19.2 ± 3.0 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$), by increasing leukocyte- (17.4 ± 3.5 vs. 7.7 ± 1.8 and 6.0 ± 1.1 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$), platelet- (13.9 ± 2.5 vs. 4.4 ± 0.7 and 5.4 ± 1.3 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$) and endothelial-derived microparticles (16.9 ± 3.6 vs. 6.4 ± 1.4 and 5.6 ± 0.8 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$). The mixture of MCTs/LCTs significantly increased cardiac and vascular NO \cdot and O $_2^{\cdot-}$ production, pI κ B and COX-2 expression compared to the lipid emulsion containing only LCTs.

Conclusion: Compared to 5% dextrose, MCT/LCT supplementation during septic shock in rats induced deleterious effects with increased inflammation, cell activation, associated to vascular hyporeactivity. During septic shock, LCT supplementation seemed to be neutral compared to 5% dextrose infusion.

KEY WORDS: lipid emulsions; parenteral nutrition; membrane remodeling; inflammation; microparticles; septic shock.

INTRODUCTION

Fatty acids (FAs) are known to interfere with many physiological processes, including inflammation and immunity . Inflammatory response modulation in critically ill patients through the modulation of lipid content in parenteral emulsion has therefore aroused clinician interest . The composition of lipid emulsions may account for changes in cell membrane composition, downstream production of eicosanoids and cytokines, as well as gene expression . Exogenous lipids could alter the cell membrane fluidity and the lipid raft organization, thereby interfering with the activity of key membrane proteins involved in immune cell signaling . Several experimental studies have evidenced the regulatory role of lipid rafts after incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that limited T cell activation and the immune response . The n-6 and n-3 PUFAs content of immune cell plasma membranes can be modulated by eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) intake . Interestingly, n-6 PUFAs ingestion may acutely alter the endothelial function, resulting in an increased generation of circulating endothelial microparticles (MPs) . MPs are plasma membrane submicron vesicles, released from the cell in response to inflammatory signals following the translocation of procoagulant phosphatidylserine in the outer leaflet (PhtdSer) . Numerous experimental studies have also demonstrated that MPs behave as vascular and cellular effectors . In sepsis, circulating MPs may indeed promote inflammation and vascular cell apoptosis, contribute to hemodynamic dysfunction, coagulation activation and multiple organ failure . The purpose of this study was therefore to assess the effects of two parenteral nutrition lipid emulsions on the modulation of inflammation, procoagulant MP release and hemodynamic during septic shock in rats.

MATERIALS AND METHODS

This study was performed with the approval of the Strasbourg Regional Committee of Ethics in Animal Experimentation (CREMEAS, AL/69/76/02/13).

Industrial lipid emulsions for parenteral nutrition

Intralipid® (soybean oil 200 g/L – long-chain triglycerides, LCTs) was from Fresenius-Kabi (Bad Homburg, Germany) and Medialipid® (soybean 100 g/L – LCTs, coconut oil 100 g/L – medium-chain triglycerides, MCTs) from B Braun (Melsungen, Germany). Their n-3 PUFAs content was only α -linolenic acid (18:1n-3) and neither of the emulsions contained EPA (20:5n-3) or DHA (22:6n-3); the n-3/n-6 ratio was the same in both emulsions (see Table I, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A232>).

Cecal ligation and puncture model and infusion with lipid emulsions for parenteral nutrition

Male Wistar rats (300-350 g) were from Javier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). During surgical procedures, rats were anesthetized with isoflurane 1-2% (Baxter S.A.S, Maurepas, France) and analgesia was ensured by sufentanil (Mylan, Pittsburgh PA, USA) (0.1 μ g/kg of body weight) administered subcutaneously. Before skin incision, a subcutaneous injection of 0.1 mL lidocaine 1% (AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) was performed.

Rats underwent cecal ligation and puncture (CLP) as previously described . The rats developed septic shock within the 16–20 hours after CLP. Sham rats underwent laparotomy and cecal exposure. The right internal jugular was catheterized and the catheter was tunneled between the ears.

Rats were then allocated to six groups of 12 animals each: sham-G5, sham-IL, sham-ML, CLP-G5, CLP-IL and CLP-ML. The randomly allocated lipid emulsion was infused at

identical rates during 22 hours (1.5 g/kg/24 hours, according to human nutrition guidelines). The control groups (sham-G5 and CLP-G5) were infused with 5% dextrose under identical conditions. The lipid emulsion or dextrose infusion was not stopped for the next 22 hours until the end of the experiment. No animal died before the end of the experiment.

After 18 hours, when CLP rats fulfilled illness criteria (lethargy, piloerection, glassy eyes), rats were anesthetized, tracheotomised and mechanically ventilated. The right carotid artery was gently exposed and a transit-time ultrasound flow probe of 2.0 mm (Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) was attached to the carotid artery to continuously measure carotid blood flow (CBF). The left femoral artery was used to measure mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and to collect blood samples. For the CLP group, septic shock was assessed if MAP was <90 mmHg and lactate elevated.

In CLP groups, fluid resuscitation was performed with a bolus of 0.9% NaCl (500 μ L/10 min. if MAP was <100 mmHg); if MAP remained <100 mmHg, norepinephrine was infused and increased by step of 0.1 μ g/kg/min each 10 minutes to target a MAP above 100 mmHg.

After 240 min., rats were bled *via* the left carotid artery under sterile condition using endotoxin-free material. The total blood volume was collected in sodium citrate tubes (Vacutainer™, Becton Dickinson; Le Pont de Claix, France), organs were collected for western blotting analysis and electron paramagnetic resonance measurements.

Quantification of procoagulant microparticles

Blood samples were centrifuged for 15 min. at 800 g; plasma was centrifuged 2 min. at 12,000 g to obtain platelet-poor plasma (PPP). PPP was centrifuged twice at 12,000 g for 60 min. to pellet MPs. The MP pellets were suspended in 150 μ L of 0.9% NaCl, pooled and concentrated by centrifugation for 60 min. at 12,000 g. Washed pellet suspensions (500 μ L of 0.9% NaCl) were kept at 4°C for less than 2 weeks.

To specifically analyze the generation of procoagulant MPs, MP quantification was performed by functional prothrombinase assay as described elsewhere . Briefly, after three washes, the amount of MPs insolubilized onto annexin-5 coated microplates was measured by prothrombinase assay in which phosphatidylserine (PhtdSer) is the limiting factor of the reaction leading to thrombin generation. The measurements were performed in a kinetic mode with a thermostated spectrophotometer (VersaMax™ Molecular Device, USA). The absorbance was converted into nanomolar equivalent phosphatidylserine (eq. PhtdSer) by reference to a calibration curve made of known concentrations of synthetic vesicles containing 33% w/w PhtdSer and 67% w/w PhtdChol) .

Characterization of the microparticle cell origin

MP phenotype was assessed according to the expression of cellular specific membrane antigens using biotinylated monoclonal antibodies (anti-CD61 – platelet GP_{IIIa} (β_3), anti-CD45 – leukocyte common antigen, anti-CD54 – ICAM-1 for endothelial cells [BioLegend, San Diego, CA, USA] and anti-glycophorin for erythrocytes [Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA]). MPs were measured after capture onto each specific antibody coated on the streptavidin plate (1 μ g/well) as described above.

Electron paramagnetic resonance (EPR)

Nitric oxide (NO \cdot): Aorta and heart samples were incubated for 30 min. in Krebs–Hepes buffer containing: bovine serum albumin (20.5 g/L), CaCl₂ (3 mM), and L-arginine (0.8 mM). NaDETC (3.6 mg) (DETC: diethyldithiocarbamate) and FeSO₄·7H₂O (2.25 mg) were separately dissolved under nitrogen gas bubbling in 10-mL volumes of ice-cold Krebs–Hepes buffer. These compounds were rapidly mixed to obtain a pale yellow-brown opalescent colloid Fe(DETC)₂ solution (0.4 mM), which was used immediately. The colloid Fe(DETC)₂

solution was added to the organs and incubated for 45 min. at 37°C. NO[•] measurement was performed on a table-top x-band spectrometer Miniscope (Magnettech, MS200, Berlin, Germany). Recordings were made at 77°K, using a Dewar flask. Instrument settings were 10 mW of microwave power, 1 mT of amplitude modulation, 100 kHz of modulation frequency, 60 seconds of Sweep time, and 5 numbers of scans.

Superoxide anion (O₂^{•-}): Aorta and heart samples were allowed to equilibrate in deferoxamine-chelated Krebs–Hepes solution containing 1 hydroxy-3 methoxycarbonyl 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen, Germany) (500 μM), deferoxamine (25 μM), and DETC (5 μM) under constant temperature (37°C) for 1 hour. The reaction was stopped by freezing the samples in liquid nitrogen for EPR spectroscopy analysis

Values were expressed as arbitrary units per milligram weight of dried tissue (A/Wd).

Western immunoblotting

Phosphorylated I kappa B-alpha (pIκB-α), nuclear factor-kappa B (NF-κB) and cyclooxygenases-2 (COX-2) expression was evaluated in heart and aorta lysates using Western immunoblotting. Proteins were separated by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF (PolyVinylidene Fluoride) membrane. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skimmed milk in Tris-Buffered Saline solution with 0.5% Tween for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against pIκB-α (1/500, Euromedex, Souffelweyersheim, France), NF-κB p65 (1/1,000, Ozyme, Saint Quentin, France), COX-2 (1/1,000 Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI), β-tubuline (1/10,000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After 3 washes, membranes were incubated with secondary antibodies (1/5,000 dilution except for anti-β-tubuline that revealed with a 1/40,000 dilution of anti-mouse IgG) for 1 hour at room

temperature and signals were revealed by chemiluminescence. The optical density was quantified and expressed relative to β -tubulin (imageJ).

Statistical analysis

The inter-group comparison of hemodynamic parameters was performed by ANOVA repeated measures; the pairwise comparison was made using a Tukey-Kramer adjustment for p values. A nonparametric analysis by Kruskal Wallis test with Dunn post hoc test was used for analysis of MPs, proteins, NO \cdot and O $_2^{\cdot-}$. All statistics was performed with StatviewTM software (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA). All values are presented as mean \pm SD for n experiments; with n representing the number of rats. A p value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides increases septic shock-induced vascular hyporeactivity

Lipid emulsions had no adverse effect in sham rats (sham-IL and sham-ML), as hemodynamic parameters (HR, MAP, CBF), microparticles, western immunoblottings and EPR were unaltered compared to 5% dextrose-infused sham rats (sham-G5). The infusion of lipid emulsions containing LCTs (Intralipid[®] - IL) or a mixture of LCTs/MCTs (Medialipid[®] - ML) had no effect (MAP, HR, CBF and blood lactate) compared to 5% dextrose infusion on the early phase of infection in CLP rats, up to the 18th hour after surgery (see Table I, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A232>).

At the end of the 4-hours resuscitation period (18th to 22th hours), MAP, HR, CBF and blood lactate were still not significantly different and all CLP rats survived (see Table I, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A232>). Nevertheless, the LCT/MCT emulsion increased septic shock-induced vascular hyporeactivity evidenced by an increased norepinephrine requirement to reach the targeted MAP compared to 5% dextrose (2.7 ± 0.2 vs. 1.9 ± 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, $p < 0.05$), while LCT emulsion had no effect (1.2 ± 0.3 vs. 1.9 ± 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, NS) (see Table I, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A232>).

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides increases alters membrane vesiculation

In the CLP groups (CLP-G5, CLP-IL, CLP-ML), total MPs, leukocyte-, platelet- and endothelial-derived MPs were significantly increased compared to sham rats (figures 1a and b). Microparticle generation was significantly increased in CLP-ML rats compared to CLP-G5 rats and CLP-IL rats (38.6 ± 5.8 vs. 18.8 ± 3.0 and 19.2 ± 3.0 nM Eq PhtdSer respectively,

$p < 0.05$) (figure 1a), as well as leukocyte- (17.4 ± 3.5 vs. 7.7 ± 1.8 and 6.0 ± 1.1 nM Eq PhtdSer respectively, $p < 0.05$), platelet- (13.9 ± 2.5 vs. 4.4 ± 0.7 and 5.4 ± 1.3 nM Eq PhtdSer respectively, $p < 0.05$) and endothelial-derived MPs (16.9 ± 3.6 vs. 6.4 ± 1.4 and 5.6 ± 0.8 nM Eq PhtdSer respectively, $p < 0.05$) (figure 1b). Of note, MP generation (concentration and phenotype) was not significantly different between CLP-IL and CLP-G5 rats (figures 1a and b).

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides increases cardiovascular oxidative and nitrosative stresses

NO^\cdot and O_2^\cdot production was significantly increased in the aorta (174.8 ± 14.7 vs. 130.2 ± 18.5 and 708.2 ± 35.6 vs. 496.3 ± 45.8 amplitude/Wd respectively, $p < 0.05$) (figures 2a and 2c) and heart (158.7 ± 15.7 vs. 110.3 ± 7.3 and 786.3 ± 29.6 vs. 579.1 ± 62.6 amplitude/Wd respectively, $p < 0.05$) of CLP-ML rats compared to CLP-IL rats (figures 2b and 2d). Compared with sham rats, NO^\cdot and O_2^\cdot were significantly increased in aorta and heart from CLP-G5 rats but not in aorta and heart from CLP-IL rats (figures 2a, 2b, 2c and 2d). NO^\cdot and O_2^\cdot production was not different in CLP-IL and CLP-G5 groups, except a significant increase of cardiac NO^\cdot in CLP-IL rats compared to CLP-G5 rats (figure 2b).

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides modulates vascular inflammation

NF- κ B activation was evidenced through the assessment of the phosphorylation of its inhibitor I κ B resulting in the translocation of free NF- κ B to the nucleus and the transcription of pro-inflammatory genes. In the aorta, pI κ B- α was significantly increased in CLP-G5 rats compared with sham-G5 rats (0.2 ± 0.0 vs. 0.1 ± 0.0 relative to β -tubulin content, $p < 0.05$) as well as in CLP-ML rats compared with CLP-IL rats (0.4 ± 0.1 vs. 0.1 ± 0.0 relative to β -tubulin content, $p < 0.05$) (figure 3a), while NF- κ B expression remained unchanged (data not shown).

Similarly, in heart samples of CLP-G5 rats, pI κ B- α expression was significantly increased compared with sham-G5 rats (1.0 ± 0.2 vs. 0.3 ± 0.1 relative to β -tubulin content, $p<0.05$), while NF- κ B expression remained unaltered (data not shown). Moreover, cardiac pI κ B- α expression was significantly increased in CLP-ML rats compared with CLP-IL rats (1.8 ± 0.1 vs. 0.6 ± 0.2 relative to β -tubulin content, $p<0.05$) (figure 3b). Finally, pI κ B- α was significantly increased in CLP-ML group compared with CLP-G5 in both heart and aorta (figures 3a and 3b).

In the aorta, COX-2 expression was significantly increased in CLP-G5 rats compared to sham-G5 rats (1.4 ± 0.2 vs. 0.9 ± 0.2 relative to β -tubulin content, $p<0.05$), as well as in CLP-ML rats compared to CLP-IL (2.1 ± 0.3 vs. 1.0 ± 0.1 relative to β -tubulin content, $p<0.05$) (figure 3c). Cardiac COX-2 expression was also significantly increased in CLP-G5 rats compared to sham-G5 rats (1.4 ± 0.1 vs. 0.4 ± 0.0 relative to β -tubulin content, $p<0.05$). COX-2 expression was also significantly increased in CLP-ML rats compared with CLP-IL rats (1.5 ± 0.2 vs. 0.5 ± 0.0 relative to β -tubulin content, $p<0.05$) (figure 3d). COX-2 was significantly increased in CLP-ML group compared with CLP-G5 in both heart and aorta (figures 3c and 3d).

DISCUSSION

Fatty acid supplementation leads to plasma membrane remodeling and may thus affect immune functions with clinical consequences in patients with inflammatory diseases . We therefore hypothesized that lipid emulsion supplementation could alter membrane vesiculation and MP release, thereby modulating inflammation and hemodynamic status in septic rats . Thus, we investigated the hemodynamic function of septic rats and used MPs as surrogates of vascular cell damage.

In the present study, we have not shown any beneficial or deleterious effects of LCT or LCT/MCT parenteral lipid emulsions on sham rats. Moreover, these emulsions did not prevent or worsen septic shock issue. Nevertheless, we have shown that the infusion of a mixture of MCTs and LCTs may exacerbate the septic shock-induced hemodynamic dysfunction, enhancing the activation of vascular cells, inflammatory processes and cardiovascular oxidative and nitrosative stresses.

We have also shown that the emulsion containing a mixture of MCTs and LCTs (Medialipid[®]) significantly increased membrane vesiculation in septic rats, compared with the emulsion containing only LCTs (Intralipid[®]) or with 5% dextrose. These data are consistent with previous works showing that FAs are differentially incorporated into the cell membrane depending on the length of their carbon chain, which leads to increased membrane vesiculation with increased phospholipid membrane disorder in emitted MPs . In contrast, n-3 FAs decrease the concentration of circulating MPs in post-myocardial infarction patients, suggesting that n-3 FAs might alter membrane vesiculation . In addition, recent data from our laboratory suggest that a mixture of MCTs and LCTs would have an energetic function, but

would also take part in membrane vesiculation, by being incorporated in membranes and by altering their physical order .

To further characterize the *in vivo* FA effects on membrane vesiculation, we have established the phenotype of circulating MPs. We focused on procoagulant MPs exposing phosphatidylserine, which have been shown to behave as pathogenic markers in experimental septic shock and as markers of coagulation disturbance in clinical trials . We have thus shown that a mixture of MCTs and LCTs significantly alters the MP phenotype, with an increased generation of circulating leukocyte-, platelet- and endothelial-derived MPs, reflecting their parental cell activation. In contrast, LCTs do not seem to have any effect on cellular activation in septic rats as indicated by the unchanged MP pattern.

Furthermore, lipid emulsions containing a mixture of MCTs and LCTs promoted enhanced pro-inflammatory markers in aorta and heart tissues. Therefore, MCT infusion could lead to procoagulant and pro-inflammatory MP release, which might in turn deeply alter the cell membrane and increase further cell damages.

Lipid emulsions containing a mixture of MCTs and LCTs would have specific clinical advantages over lipid emulsions containing LCTs alone. Several studies indeed suggest their superiority, with improved nutritional status in septic and cancer patients undergoing surgery . Indeed, the MCT/LCT emulsion was shown to increase patient prealbumin levels, which would be partially due to the higher circulating insulin levels. However, the outcome of septic patients or the length of hospital stay, the surgical complication rate in tract cancer patients following surgery were not significantly different, whatever the emulsion considered. Moreover, a recent review by Casaer and Van den Berghe failed to evidence any benefit in lipid modulation during septic shock .

More interestingly, emulsions containing a mixture of MCTs and LCTs would be less immunosuppressive than LCT emulsions. The former would be associated with reduced alterations of human monocyte and neutrophil functions, with subsequent limited infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Experimental and clinical data however diverge, as in patients with acute respiratory distress syndrome, Masclans *et al.* showed that LCT emulsions increased cardiac output and oxygen delivery, while Smyrniotis *et al.* showed that it worsened oxygenation.

FAs may interfere with inflammation by numerous mechanisms, including their incorporation into the phospholipids of inflammatory cell membranes, as we have evidenced it in monocytes after LPS stimulation and as it has been shown in other models. Furthermore, FAs are known to affect inflammation through the NF- κ B pathway. Indeed, n-3 FAs inhibit the LPS-induced production of inflammatory proteins like COX-2, *in-vitro* and *in vivo*. In our study, a mixture of MCTs and LCTs would have the opposite effect and up-regulate the NF- κ B pathway with increased I κ B phosphorylation and subsequent inflammatory protein expression, as it has been shown *in-vitro* with saturated FAs, especially lauric acid (C12:0). In contrast, LCTs seemed neutral compared to 5% dextrose.

Some fatty acid receptors may be involved in the regulation of these anti-inflammatory effects like the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR- γ), a transcription factor that down-regulates the NF- κ B pathway when bound to PUFAs. The LCT receptor GPR120, which is highly expressed on inflammatory cells mediating anti-inflammatory gene activation, and the MCT pro-inflammatory receptor GPR84, that promotes cytokine secretion in LPS-treated neutrophils and macrophages, could also have contributed to the respective effects of MCTs and LCTs in our study. Moreover, several LCTs have been shown to decrease leukocyte chemotaxis towards inflammatory sites, contrary to MCTs. N-3 LCTs also decrease arachidonic acid-derived pro-inflammatory eicosanoids and COX-2 pathway and increase the

production of resolvin and protectin . Our study therefore confirms a previous body of evidences showing that MCT-based lipid emulsions in-vitro affect immune cell functions in-vitro. Indeed, previous data showed that MCTs, but not LCTs, alter neutrophils functions , with inhibitory effects on chemotaxis, phagocytosis, and bacterial killing in-vitro, as well as in cell signaling .

Limitations of the study: Given the severity of our septic shock model, we have deliberately chosen to study only one time-point; moreover, repeated blood sampling was impossible due to low blood volume. As the timing to introduce artificial nutrition in critical patients is a matter of debate and there is still no consensus , we assume that the timing of lipid infusion during our experiments could be considered as a limitation of the study.

CONCLUSION

This experimental work shows that supplementation by lipid emulsion containing MCTs and LCTs, but neither lipid emulsion containing only LCTs nor 5% dextrose, exacerbates the peritonitis-induced septic shock, *via* pro-inflammatory pathway with an intense MP generation reflecting the vascular cell activation. These data could pave the way for further investigations during septic shock in humans.

References

1. Wanten GJ and Calder PC: Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr* 85(5):1171-84, 2007.
2. Waitzberg DL, Torrinhas RS and Jacintho TM: New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30(4):351-67, 2006.
3. Calder PC: Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol* 668 Suppl 1:S50-8, 2011.
4. Calder PC: Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 142(3):592S-599S, 2012.
5. Yaqoob P: The nutritional significance of lipid rafts. *Annu Rev Nutr* 29:257-82, 2009.
6. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C and Seed B: Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8(6):723-32, 1998.
7. Siddiqui RA, Harvey KA, Zaloga GP and Stillwell W: Modulation of lipid rafts by Omega-3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support. *Nutr Clin Pract* 22(1):74-88, 2007.
8. Sutherland WH, de Jong SA, Hessian PA and Williams MJ: Ingestion of native and thermally oxidized polyunsaturated fats acutely increases circulating numbers of endothelial microparticles. *Metabolism* 59(3):446-53, 2010.
9. Meziani F, Delabranche X, Asfar P and Toti F: Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care* 14(5):236, 2010.
10. Boisrame-Helms J, Delabranche X, Degirmenci SE, Zobairi F, Berger A, Meyer G, Burban M, Mostefai HA, Levy B, Toti F and Meziani F: Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb Haemost* 111(1):154-64, 2014.
11. Distler JH, Jungel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, 3rd, Gay RE, Michel BA, Fontana A, Gay S, Pisetsky DS and Distler O: The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8):2892-7, 2005.
12. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Cales P, Henrion D, Andriantsitohaina R, Mercat A, Asfar P and Meziani F: Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 37(6):2045-50, 2009.
13. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI and Chaudry IH: Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 Suppl 1:52-7, 2005.
14. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, Griffiths R, Kreyman G, Leverve X, Pichard C and Espen: ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care. *Clin Nutr* 28(4):387-400, 2009.

15. Hugel B, Zobairi F and Freyssinet JM: Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2:1846-1847, 2004.
16. Angus DC and van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369(21):2063, 2013.
17. Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM and Carneiro-Sampaio MM: Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, and oxidative activity. *J Leukoc Biol* 53(4):404-10, 1993.
18. Boisrame-Helms J, Delabranche X, Klymchenko A, Draï J, Blond E, Zobairi F, Mely Y, Hasselmann M, Toti F and Meziani F: Lipid Emulsions Differentially Affect LPS-Induced Acute Monocytes Inflammation: In Vitro Effects on Membrane Remodeling and Cell Viability. *Lipids*, 2014.
19. Del Turco S, Basta G, Lazzarini G, Evangelista M, Rainaldi G, Tanganelli P, Christensen JH, Schmidt EB and De Caterina R: Effect of the administration of n-3 polyunsaturated fatty acids on circulating levels of microparticles in patients with a previous myocardial infarction. *Haematologica* 93(6):892-9, 2008.
20. Delabranche X, Boisrame-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet JM, Toti F and Meziani F: Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 39(10):1695-703, 2013.
21. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Garmendia JL, Jimenez-Jimenez LM, Garnacho-Montero MC and Barrero-Almodovar A: Clinical and metabolic effects of two lipid emulsions on the parenteral nutrition of septic patients. *Nutrition* 18(2):134-8, 2002.
22. Chen FM, Wang JY, Sun LC, Juang RF, Huang TJ and Hsieh JS: Efficacy of medium-chain triglycerides compared with long-chain triglycerides in total parenteral nutrition in patients with digestive tract cancer undergoing surgery. *Kaohsiung J Med Sci* 21(11):487-94, 2005.
23. Casaer MP and Van den Berghe G: Nutrition in the acute phase of critical illness. *N Engl J Med* 370(25):2450-1, 2014.
24. Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Salgado MM, Hypolito IP, Colletto GM, Yagi O, Yamamuro EM, Gama-Rodrigues J and Pinotti HW: Effect of total parenteral nutrition with different lipid emulsions of human monocyte and neutrophil functions. *Nutrition* 13(2):128-32, 1997.
25. Iovinelli G, Marinangeli F, Ciccone A, Ciccozzi A, Leonardis M, Paladini A and Varrassi G: Parenteral nutrition in ventilated patients with chronic obstructive pulmonary disease: long chain vs medium chain triglycerides. *Minerva Anestesiologica* 73(1-2):65-76, 2007.
26. Masclans JR, Iglesia R, Bermejo B, Pico M, Rodriguez-Roisin R and Planas M: Gas exchange and pulmonary haemodynamic responses to fat emulsions in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 24(9):918-23, 1998.

27. Smyrniotis VE, Kostopanagiotou GG, Arkadopoulos NF, Theodoraki KA, Kotsis TE, Lambrou AT and Vassiliou JG: Long-chain versus medium-chain lipids in acute pancreatitis complicated by acute respiratory distress syndrome: effects on pulmonary hemodynamics and gas exchange. *Clin Nutr* 20(2):139-43, 2001.
28. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH and Hwang D: Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276(20):16683-9, 2001.
29. Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS and Hwang DH: Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol* 174(9):5390-7, 2005.
30. Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B and Haegeman G: A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* 544:181-96, 2003.
31. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM and Olefsky JM: GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142(5):687-98, 2010.
32. Suzuki M, Takaishi S, Nagasaki M, Onozawa Y, Iino I, Maeda H, Komai T and Oda T: Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem* 288(15):10684-91, 2013.
33. Calder PC: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 75(3):645-62, 2013.
34. Wanten GJ, Roos D and Naber AH: Effects of structurally different lipid emulsions on human neutrophil migration. *Clin Nutr* 19(5):327-31, 2000.
35. Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM and Carneiro-Sampaio MM: Effect of medium- and long-chain triglycerides on human neutrophil migration. *Braz J Med Biol Res* 25(4):369-73, 1992.
36. Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Yamaguchi N, Massili-Oku S, Salgado MM, Hypolito IP, Soares SC, Goncalves EL and Furst P: Influence of medium-chain triglyceride-based lipid emulsion on rat polymorphonuclear cell functions. *Nutrition* 12(2):93-9, 1996.
37. Casaer MP and Van den Berghe G: Nutrition in the acute phase of critical illness. *N Engl J Med* 370(13):1227-36, 2014.

Figures 1a and 1b: Quantification (a) and phenotype (b) of microparticles

CLP: cecal ligation and puncture, G5: 5% dextrose, IL: Intralipid[®], ML: Medialipid[®], MPs: microparticles, nM Eq PhtdSer: nanomolar phosphatidylserine equivalents. n=12, * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5, & p<0.05 vs. CLP-G5.

Figures 2a, 2b, 2c and 2d: Vascular and cardiac nitrosative and oxidative stresses

Nitric oxide (NO[·]) and superoxide anion (O₂^{·-}) measured by electron paramagnetic resonance in the aorta (2a and 2c) and heart (2b and 2d). CLP: cecal ligation and puncture, G5: 5% dextrose, IL: Intralipid[®], ML: Medialipid[®]. n=6, * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5, & p<0.05 vs. CLP-G5.

Figures 3a, 3b, 3c and 3d: Vascular and cardiac pIκB-α and COX-2 expressions relative to β-tubulin content evaluated by Western immunoblotting in the aorta (3a and 3c) and heart (3b and 3d). CLP: cecal ligation and puncture, G5: 5% dextrose, IL: Intralipid[®], ML: Medialipid[®]. n=6, * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5, & p<0.05 vs. CLP-G5.

Figure 1a

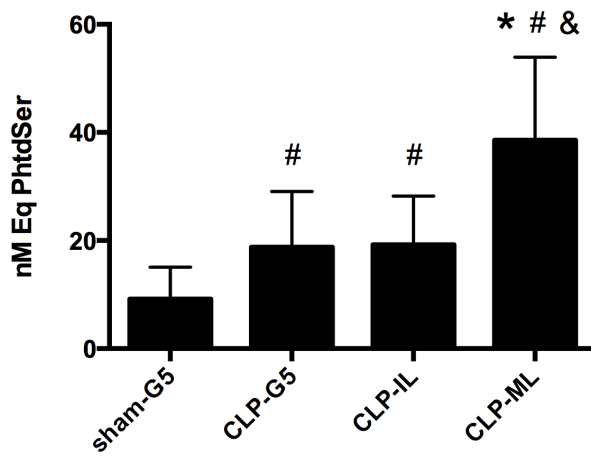


Figure 1b

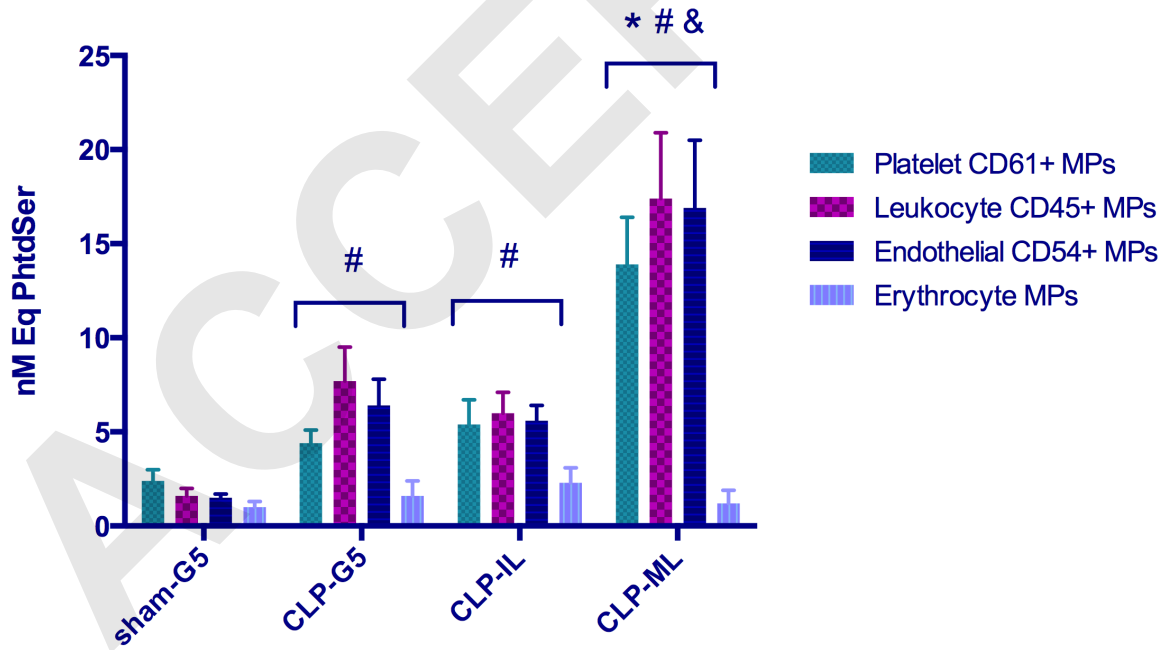


Figure 2a

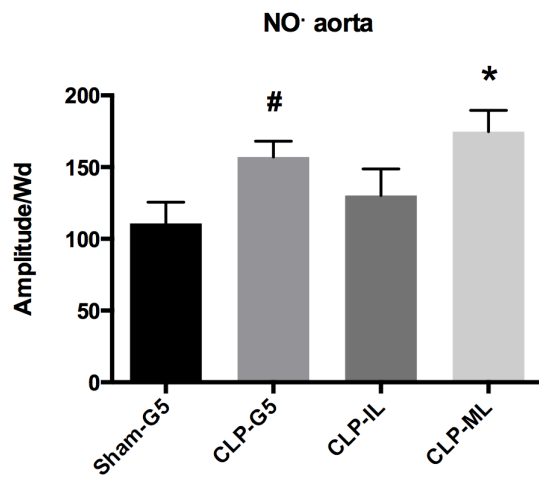


Figure 2b

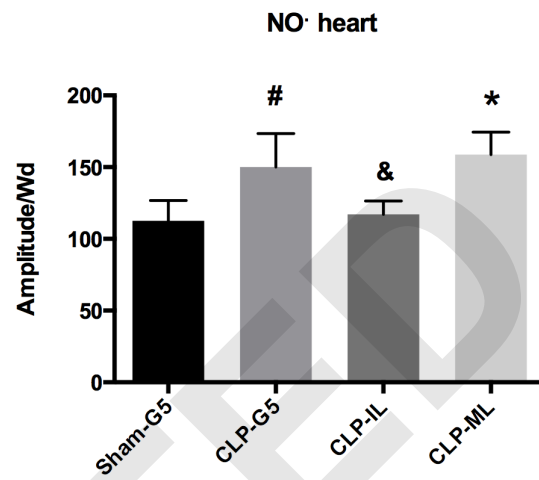


Figure 2c

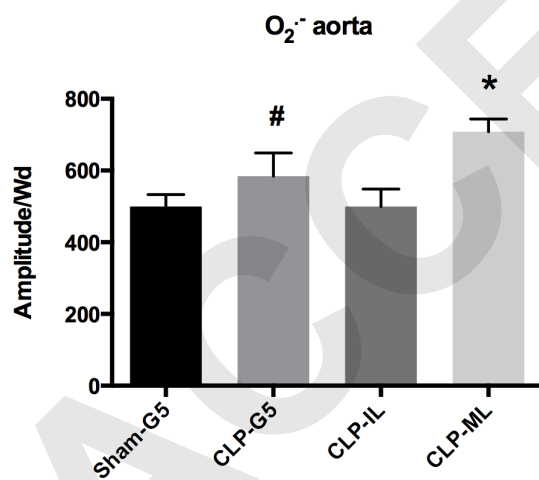


Figure 2d

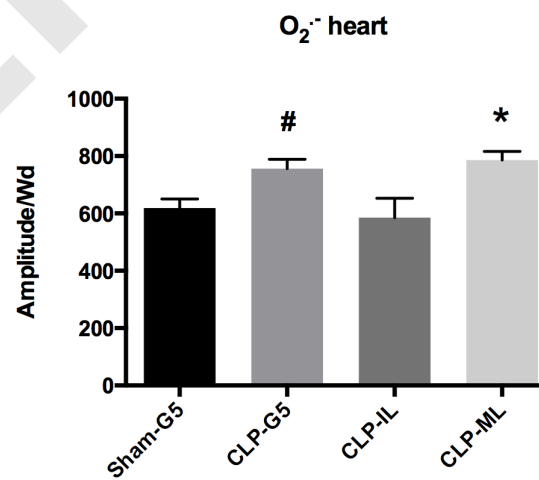


Figure 3a

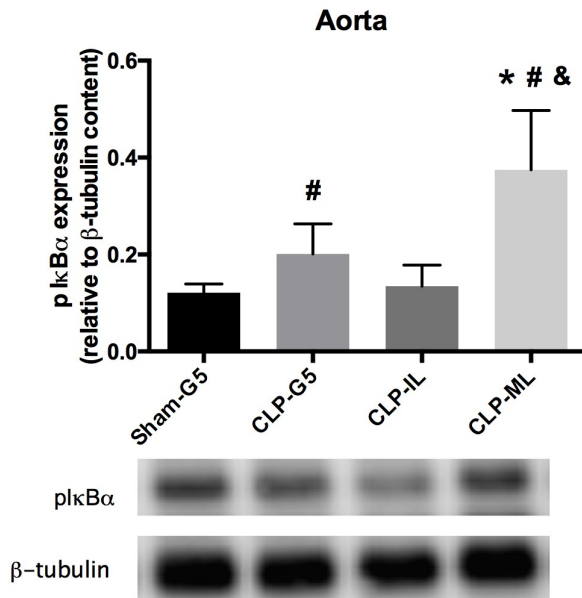


Figure 3b

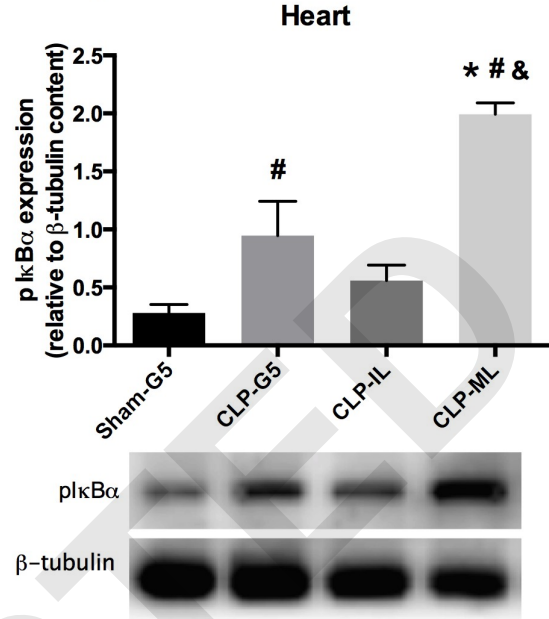


Figure 3c

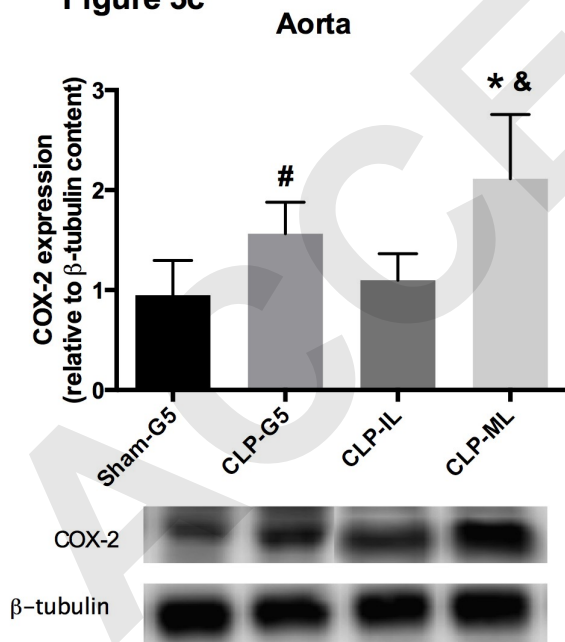


Figure 3d

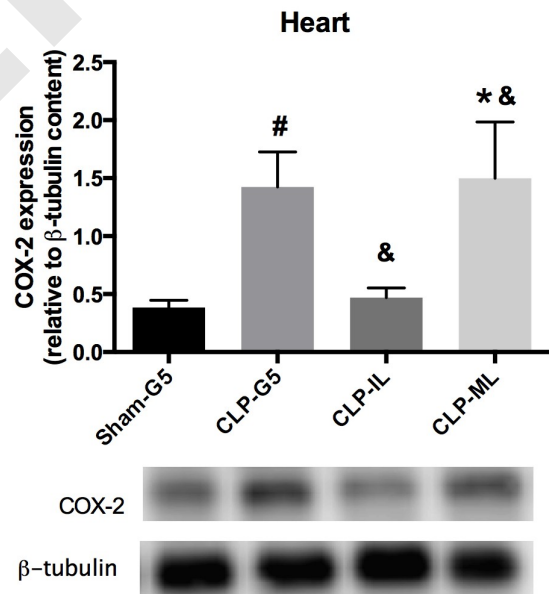


Table I: Characteristics of rats

CLP: cecal ligation and puncture, G5: dextrose 5%, IL: Intralipid[®], ML: Medialipid[®], MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, bpm: beat per minute, CBF: carotid blood flow, NE: norepinephrine, baseline: H18 after CLP/sham operation, end of experiment: H22 after CLP/sham operation, MPs: microparticles, nM eq. PhtdSer: nanomolar phosphatidylserine equivalents, SD: standard deviation. For each group, n=12. * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5.

Mean ± SD	Sham-G5	Sham-IL	Sham-ML	CLP-G5	CLP-IL	CLP-ML
Weight (g)	358±9	358±9	363±5	349±8	353±7	353±7
Diuresis (mL)	14.9±3.8	18.5±2.4	17.6±5.7	7.3±2.3 [#]	9.9±2.4 [#]	9.0±2.4 [#]
MAP (mmHg)						
Baseline	119±4	120±3	120±3	72±6 [#]	71±7 [#]	72±6 [#]
End experiment	116±4	114±7	117±4	111±7	106±8	105±7
HR (bpm)						
Baseline	356±12	349±19	358±14	398±31 [#]	375±12 [#]	405±16 [#]
End experiment	381±14	369±20	391±19	417±40	390±11	382±29
CBF (mL/min)						
Baseline	4.5±0.8	4.0±0.4	4.8±0.3	2.6±0.7 [#]	2.9±0.8 [#]	2.8±0.8 [#]
End experiment	3.6±0.5	3.2±0.5	4.2±0.6	2.5±0.4 [#]	2.7±0.6	2.9±0.6 [#]
NaCl (mL/h)	1.0±0	1.0±0.0	1.0±0.0	2.5±0.5 [#]	2.4±0.3 [#]	2.7±1.1 [#]
NE (µg/kg/min)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.9±0.8 [#]	1.2±0.3 [#]	2.7±0.2 ^{**}
Lactate (mmol/L)	1.1±0.2	0.9±0.1	1.0±0.1	2.8±0.4 [#]	2.6±0.1 [#]	2.4±0.2 [#]
Survival (min)	240±0	240±0	240±0	240±0	240±0	240±0

Article 4

Potentiels des produits naturels alimentaires à promouvoir la fonction endothéliale et vasculaire

Potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health

Cyril Auger, Amissi Said, Phuong Nga Nguyen, Nouredine Idris-Khodja and
Valérie B. Schini-Kerth

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existait une association inverse entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et la consommation de produits naturels riches en polyphénols tels que les fruits, les légumes, le vin rouge, le cacao et le thé et les acides gras polyinsaturés type oméga-3. L'effet bénéfique des polyphénols et des oméga-3 (EPA, DHA) sur la santé cardiovasculaire a été attribué en partie à leur effet direct sur les vaisseaux sanguins et plus particulièrement sur l'endothélium. En effet, des études expérimentales et cliniques ont révélé que les polyphénols et l'EPA:DHA sont capables d'augmenter la formation endothéliale de facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de réponses pro-inflammatoires et pro-thrombotiques, et d'améliorer la dysfonction endothéliale et le stress oxydant vasculaire qui contribuent au développement des pathologies cardiovasculaires majeures comme l'hypertension artérielle. Cette revue de synthèse présente de façon non exhaustive les données de la littérature démontrant les effets protecteurs des polyphénols et des oméga-3 sur la fonction endothéliale ainsi que les mécanismes sous-jacents.

Journal of Cardiovascular Pharmacology

Potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health
Article Type:	Invited Review Article
Section/Category:	Invited Review Series
Keywords:	Endothelial function; nitric oxide; polyphenols; food; omega-3 fatty acids
Corresponding Author:	Valerie B Schini-Kerth, PhD Faculty of Pharmacy ILLKIRCH, France FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Faculty of Pharmacy
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Cyril Auger, PH.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Cyril Auger, PH.D. Amissi Said Phuong Nga Nguyen Noureddine Idris-Khodja, Ph.D. Valerie B Schini-Kerth, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	<p>Endothelial dysfunction is now well established as a pivotal early event in the development of major cardiovascular diseases including hypertension, atherosclerosis and diabetes. The alteration of the endothelial function is often triggered by an imbalance between the endothelial formation of vasoprotective mechanisms including the formation of nitric oxide (NO) and endothelium-dependent hyperpolarization, and an increased level of oxidative stress involving several pro-oxidant enzymes such as NADPH oxidase and, often also, the appearance of cyclooxygenase-derived vasoconstrictors. Pre-clinical studies have indicated that polyphenol-rich food and food-derived products such as grape-derived products, black and red berries, green and black teas and cocoa, and omega-3 fatty acids can trigger activating pathways in endothelial cells promoting an increased formation of NO and endothelium-dependent hyperpolarization. Moreover, intake of such food-derived products has been associated with the prevention and/or the improvement of an established endothelial dysfunction in several experimental models of cardiovascular diseases and in Humans with cardiovascular diseases. Therefore, intake of certain polyphenol-rich products and omega-3 fatty acids appears to be an attractive approach for a healthy vascular system.</p>
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	

Potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health

Cyril Auger, Amissi Said, Phuong Nga Nguyen, Noureddine Idris-Khodja, Valérie B. Schini-Kerth

UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie,
Université de Strasbourg, France

Address for correspondence:

Pr. Valérie Schini-Kerth

UMR CNRS 7213 - Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Université de Strasbourg - Faculté de Pharmacie

74, route du Rhin - BP 60024

67401 ILLKIRCH Cedex

France

Tel: +33 (0)3 68 85 41 27

Fax: +33 (0)3 68 85 43 13

email: valerie.schini-kerth@unistra.fr

Abstract

Endothelial dysfunction is now well established as a pivotal early event in the development of major cardiovascular diseases including hypertension, atherosclerosis and diabetes. The alteration of the endothelial function is often triggered by an imbalance between the endothelial formation of vasoprotective mechanisms including the formation of nitric oxide (NO) and endothelium-dependent hyperpolarization, and an increased level of oxidative stress involving several pro-oxidant enzymes such as NADPH oxidase and, often also, the appearance of cyclooxygenase-derived vasoconstrictors. Pre-clinical studies have indicated that polyphenol-rich food and food-derived products such as grape-derived products, black and red berries, green and black teas and cocoa, and omega-3 fatty acids can trigger activating pathways in endothelial cells promoting an increased formation of NO and endothelium-dependent hyperpolarization. Moreover, intake of such food-derived products has been associated with the prevention and/or the improvement of an established endothelial dysfunction in several experimental models of cardiovascular diseases and in Humans with cardiovascular diseases. Therefore, intake of certain polyphenol-rich products and omega-3 fatty acids appears to be an attractive approach for a healthy vascular system.

Keywords: Endothelial function, nitric oxide, polyphenols, food, omega-3 fatty acids

Introduction

Over the last few decades, several epidemiological studies have revealed an inverse relationship between the risk of cardiovascular morbi-mortality and the consumption of several dietary products such as wine, berries, cocoa, tea, spices, nuts and omega-3 fatty acids. The beneficial effect of these dietary products on the cardiovascular system has been attributable at least in part to their direct effect on blood vessels, and in particular on the endothelium. Indeed, experimental and clinical studies have indicated that dietary products and some of their components can induce a sustained formation of endothelium-derived vasoprotective factors, and improve an established endothelial dysfunction and the high level of vascular oxidative stress associated with cardiovascular diseases.

The endothelium is a cellular monolayer covering the luminal surface of all blood vessels, which has a pivotal role in the maintenance of vascular homeostasis in part by releasing potent vasoactive factors [1]. In healthy blood vessels, endothelium-dependent vasorelaxing mechanisms involve the formation of nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) and endothelium-derived hyperpolarization (EDH). In contrast, an endothelial dysfunction is observed in major cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension, diabetes, obesity, and also in vascular aging. It is characterized *ex vivo* by reduced endothelium-dependent relaxations and often also by the appearance of endothelium-dependent contractile responses associated with an increased level of oxidative stress in the arterial wall [2-9]. In Humans, the endothelial function can be evaluated by flow-mediated vasodilation (FMD), which has been recognized as a prognostic marker of future cardiovascular events in patients [10]. This non-invasive technique involves the assessment by ultrasound imaging of the vasodilatation caused by the increased endothelial formation of NO in response to shear stress due to the induction of reactive hyperemia after a temporary occlusion of the brachial artery using a cuff. Subjects with cardiovascular risk factors have a blunted ability to dilate in

response to reactive hyperemia compared to healthy subjects indicating the presence of an endothelial dysfunction, due at least in part to a reduced NO bioavailability.

This review discusses in a non-exhaustive manner the studies indicating that certain dietary products have the ability to cause a sustained endothelial formation of NO and the underlying mechanism. In addition, experimental and clinical studies evaluating the beneficial effects of natural products on the endothelial function *in vivo* will also be discussed.

Wine/berries

Several diets and food items have been shown to affect the risk of developing cardiovascular diseases. Amongst them, wine and especially red wine has received a lot of attention since it has been reported as the main contributor of the French paradox [11]. Similarly, several epidemiological studies indicated an association between chronic and moderate consumption of red wine and a reduced risk of cardiovascular morbi-mortality and risk factors [for review, see 12]. The beneficial effect of red wine consumption has been attributable, at least in part, to its ability to improve the protective endothelial function. Indeed, consumption of red wine increased FMD in healthy volunteers [13, 14] as well as in patients with coronary artery disease [15, 16] or hypercholesterolemia [17]. The high level of phenolic compounds rather than the alcoholic content has been suggested to explain the protective effect of red wine on the endothelial function. Indeed, consumption of 2 to 4 glasses of dealcoholized red wine increased FMD in healthy individuals [18, 19] and in patients with coronary artery diseases [16]. In smokers, the acute consumption of 250 ml of red wine increased FMD and reduced blood pressure [20, 21]. A reduced blood pressure after chronic dealcoholized red wine consumption (equivalent to about 3 glasses/day for 4 weeks) has also been observed in subjects at high cardiovascular risk with high-normal blood pressure or grade 1 hypertension [22], while the daily consumption of a glass of red wine for up to 20 weeks had no effect on the blood pressure in normotensive patients with carotid atherosclerosis [23].

An antihypertensive effect of red wine consumption has also been observed in several experimental models of hypertension in rats such as the L-NAME-induced hypertension [24], and the spontaneously hypertensive rats and diabetic rats [25]. Similarly, intake of red wine phenolic extracts reduced systolic blood pressure in the spontaneously hypertensive rat [26, 27], the DOCA-salt rat [28] and the angiotensin II-induced hypertensive rat [29]. The antihypertensive effect of red wine and red wine extracts is associated with an improved

endothelial dysfunction in the spontaneously hypertensive rat [26, 30, 31] and the DOCA-salt rat [28, 32]. Moreover, chronic intake of a red wine polyphenolic extract starting at a young age was able to delay the aging-related endothelial dysfunction [6], and improve an established aging-related endothelial dysfunction in middle-aged rats [7, 33]. The improved endothelial dysfunction was mostly due to a restored NO component and to a lesser extent the EDH component [6, 7, 33].

The first evidence that wine and grape-derived products can directly affect vascular tone was observed in rat aortic rings suspended in organ chambers [34]. Indeed, red wine extracts induced potent relaxations of precontracted arterial rings with a functional endothelium, whereas only small effects were observed in rings without endothelium or in the presence of a competitive endothelial NO synthase (eNOS) inhibitor, suggesting an increased endothelial formation of NO [34, 35]. Thereafter, direct evidence that a red wine extract can increase the endothelial formation of NO was obtained in the rat aorta using electron paramagnetic resonance spectroscopy [35]. Besides the rat aorta, endothelium-dependent relaxations in response to red wine and other grape-derived products have been reported in a variety of arteries including mesenteric artery, coronary artery, internal mammary artery, cerebral arterioles and also in veins such as the human saphenous vein [for review, see 36].

The signaling pathway mediating the stimulatory effect of red wine on eNOS activation indicated a redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway leading to the activation of eNOS by phosphorylation of serine 1177 and subsequent formation of NO (Figure 1). Indeed, both the relaxation and the endothelial formation of NO to a red wine extract were markedly reduced by antioxidants, membrane-permeant analogs of superoxide dismutase and polyethyleneglycol-SOD in coronary artery rings, whereas native non permeable SOD was without effect [37]. Moreover, an intracellular formation of reactive oxygen species (ROS) was observed in cultured coronary artery endothelial cells in response to the red wine extract

most likely subsequent to the autooxidation of polyphenols [38]. The pro-oxidant response in endothelial cells has been shown to trigger the Src/PI3-kinase/Akt pathway, which ultimately causes eNOS activation by increasing the phosphorylation level of Ser 1177, a positive regulator site, and the dephosphorylation of Thr 495, a negative regulator site [37, 39]. Interestingly, the red wine polyphenols induced changes in eNOS phosphorylation persist for several hours, which may explain their ability to stimulate NO formation for several hours in contrast to the relatively short-term (within 5-10 min) response to physiological agonists such as bradykinin [37]. Besides the Src/PI3-kinase/Akt pathway, red wine has also been suggested to stimulate the endothelial formation of NO through a transient increase in the calcium signal [40], and the activation of estrogen receptors alpha in certain vascular beds and /or species [41]. Indeed, endothelium-dependent relaxations to a red wine extract were observed in aortic rings from estrogen receptor alpha wild-type mice but not in those from estrogen receptor alpha knock-out mice [41]. Moreover, siRNA directed against estrogen receptor alpha prevented the formation of NO and the phosphorylation of eNOS at Ser 1177 to a red wine extract in cultured human endothelial cells [41]. However, endothelium-dependent NO-mediated relaxations in the rat aorta and eNOS phosphorylation of Ser 1177 in porcine coronary artery endothelial cells were not affected by fulvestrant, a selective estrogen receptor alpha antagonist [42].

Similarly to NO, the red wine extract induced EDH-mediated relaxations in porcine coronary artery involves the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway (Figure 1) [43].

Although the active red wine compounds remain poorly known, the evaluation of the endothelium-dependent relaxation to a great variety of red wines has indicated that the vasorelaxant activity is related to their phenolic content [44, 45]. The fractionation of a red wine extract has identified several active phenolic compounds, and in particular procyanidins and anthocyanins [39, 46]. Moreover, eNOS activation by anthocyanins is dependent on the

molecular structure of the compound, with a key role of both the B ring hydroxylation and the C3 substitution. Indeed, although petunidin-3-*O*-coumaroylglucoside induced the phosphorylation of eNOS at Ser 1177, closely related compounds such as malvidin-3-*O*-coumaroylglucoside, petunidin-3-*O*-glucoside and petunidin were poorly active [39].

Besides red wine, polyphenol-rich products such as red fruits are also strong inducers of endothelium-dependent relaxations. The comparison of several commercially available fruit juices has indicated that the vasorelaxant activity is dependent on their concentration of polyphenols [47]. Moreover, while juices from polyphenol-rich berries such as cranberry, aronia, blackcurrant and blueberry induced potent relaxations, the polyphenol-rich juices from elderberry and blackberry induced only small effects, indicating that the vasorelaxing activity is dependent not only on the quantity but also on the quality of the polyphenolic content [48].

Endothelium-dependent relaxations have been observed in response to several red fruits and berries including grape, blueberry, chokeberry, pomegranate, raspberry, cranberry and blackcurrant [for review, see 36]. Besides activating eNOS by changing its phosphorylation level within min, a polyphenol-rich purple grape juice induced also the redox-sensitive up-regulation of eNOS mRNA and protein expression in endothelial cells, leading to a sustained NO formation [49]. In addition, a reduced systolic blood pressure has been observed in several hypertensive animal models after chronic consumption of an extract derived either from grape [50, 51] or blueberry [52], and also of pomegranate juice or extract [53, 54]. In Humans, reduced systolic blood pressure has been observed after chronic supplementation with pomegranate juice in patients with either hypertension or severe carotid artery stenosis [55, 56], and with purple grape juice in hypertensive patients [57]. Intake of purple grape juice or a red grape extract also increased FMD in patients with coronary artery disease [58, 59].

Tea

Besides grape- and berry-derived products, tea consumption has also been shown to reduce the risk of cardiovascular diseases and mortality [for review, see 60]. A reduced mortality due to coronary heart diseases or stroke has been observed after chronic consumption of either green, oolong or black tea, and with one or more cups of tea/day [60-65]. Chronic intake of both green and black tea also reduced blood pressure in patients with cardiovascular diseases [61, 62, 65]. The cardiovascular protective effect has been suggested to involve an improved endothelial function since an increased FMD was observed, in a dose-dependent manner, after chronic intake of black tea in healthy volunteers [66], and of green and black tea in healthy women [67, 68] and in patients with cardiovascular risk factors [62, 63, 69].

Experimental evidence suggests that tea components act in a very similar manner as those of grape- and berry-derived products to improve the endothelial function. Indeed, the polyphenolic compounds from black and green tea stimulated the endothelial formation of NO through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway leading to the activation by phosphorylation of eNOS at Ser 1177 [38, 70, 71]. In addition, fyn, a member of the Src family, has been identified as an upstream mediator of the epigallocatechin gallate (EGCg), a major component of green tea, induced redox-sensitive PI3-kinase/Akt-mediated activation of eNOS [70]. Black tea polyphenols also induced the formation of NO through a calcium-dependent mechanism involving both intracellular and extracellular calcium, and the p38 MAPK upstream of the PI3-kinase/Akt pathway leading to the phosphorylation of eNOS at Ser 1177 and the dephosphorylation of eNOS at Thr 495 in porcine aortic endothelial cells [71]. The p38 MAPK pathway has also been involved in the activation of the estrogen receptor alpha leading to eNOS activation in response to black tea polyphenols [72]. In bovine aortic endothelial cells, green tea polyphenols also increased eNOS activation subsequent to the down-regulation of caveolin-1 both at the mRNA and protein levels, a major negative

regulator of eNOS, via activation of ERK1/2 and inhibition of p38 MAPK signaling pathways [73].

The ability of green tea catechins to induce the activation of eNOS is dependent on the structure, and in particular on the presence of the gallate moiety on C3 and the hydroxyl groups [38]. Moreover, some specific hydroxyl groups on the B and D rings (3' + 4' and 3'') appear to be key structural requirements for their ability to stimulate the endothelial NO formation [74].

Cocoa/chocolate

The potential cardiovascular beneficial effect of cocoa intake has received much attention since the study regarding the Kuna, a tribe from Central America. Indeed, the low prevalence of cardiovascular mortality in this population has been associated with their high consumption of cocoa beverages [75]. Several clinical studies have reported that cocoa-derived products, including chocolate, exert a beneficial effect on the cardiovascular system by targeting the endothelial function [76, 77]. Consumption of dark chocolate, a product rich in polyphenols, has been associated with a reduced blood pressure and an improved FMD in Humans [77-79]. An increased FMD was observed after a single intake of 22 g of dark chocolate in overweight subjects [80], whereas the ingestion of 100 g of dark chocolate for two weeks reduced blood pressure in mildly hypertensive patients [81]. The effect of cocoa/chocolate on the endothelial function has been attributed to its high content in flavonoids, and especially catechins [82, 83].

Spices

Although spices are well known to be used for flavoring, coloring, or preserving food, experimental and clinical studies indicate that they may also affect cardiovascular health. A

meta-analysis of clinical trials indicates that consumption of garlic extract is associated with reduced blood pressure [84, 85]. The antihypertensive effect has been suggested to involve its ability to inhibit angiotensin-converting enzyme activity [86] and/or the metabolism of arachidonic acid [87].

Besides garlic, capsaicin (chili pepper), oleanic acid (clove), piperine (black pepper) and ursolic acids (thyme/rosemary) have been shown to have potent antihypertensive effects in several experimental models of hypertension [88-90]. In addition, intake of cinnamon is associated with prevention of blood pressure elevation in animal models of hypertension, and also a reduced systolic blood pressure in patients with type 2 diabetes [91-93]. The active compounds capsaicin and allicin induced endothelium-dependent NO-mediated relaxations of isolated arteries [94, 95]. In addition, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, dietary capsaicin intake improved the endothelium-dependent relaxation of basilar arteries [96]. Moreover, capsaicin induced the activation and expression of eNOS in cultured endothelial cells [97].

Omega-3 fatty acids

Several clinical studies have provided evidence that an increased consumption of omega-3 fatty acids, including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) has a beneficial effect in primary and secondary prevention of cardiovascular diseases [98-100]. Chronic intake of omega-3 fatty acids has been associated with reduced blood pressure, heart rate, triglycerides level, inflammation, and also with an improved cardiac diastolic function [101, 102]. The beneficial effects of omega-3 fatty acids on the cardiovascular system may be explained, at least in part, by their ability to improve the endothelial function [103]. Omega-3 fatty acids have been shown to improve both NO- and endothelium-dependent hyperpolarization-mediated vasodilatation in patients with coronary artery diseases [104] and

in animal models of hypercholesterolemia [105, 106], and relaxation in isolated porcine coronary arteries [107]. EPA and DHA have been shown to cause a redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway leading to activation of eNOS by phosphorylation [108]. The stimulatory effect is dependent on both the ratio and the purity of omega-3 fatty acids, with an optimal response obtained by the highly purified EPA:DHA 6:1 ratio in porcine coronary artery rings [108]. Moreover, omega-3 fatty acids have also been suggested to increase the NO formation in endothelial cells due, at least in part, to changes in lipid composition in caveolae micro-domains and the redistribution of caveolin-1 promoting eNOS activation [109]. Supplementation with omega-3 fatty acids (0.8 g/kg/d) in ovariectomized rats reduced blood pressure, arterial stiffening and vascular oxidative stress, and increased endothelial function due to an increased eNOS expression and activity [110, 111]. In patients with type 2 diabetes, the dietary supplementation with 2 g of purified EPA/DHA daily for 6 weeks reduced the impaired postprandial macro- and micro-vascular functions [112]. Daily intake of 5 g EPA plus DHA for 3 weeks also increased the vasodilatation to acetylcholine in the coronary artery of heart transplanted patients [113]. Moreover, the daily intake of 1.8 g of EPA for 6 weeks by patients with documented coronary artery diseases improved both the NO-dependent and the NO-independent endothelium-dependent forearm vasodilatation [104].

In conclusion, an optimal endothelial formation of NO has a pivotal role to prevent vascular oxidative stress and the initiation of arterial remodeling and pro-atherosclerotic and pro-thrombotic responses, and, hence, the development of cardiovascular diseases. Under physiological conditions, the endothelial NO formation is constantly adjusted by stimuli such as circulating hormones, autacoids, platelet- and blood-derived products in a very fine-tuning manner. There is now more and more experimental and clinical evidence indicating that nutritional-derived natural products such as certain fruits, fruit-derived beverages, and fish can

also contribute to increase the protective endothelial function. Despite the relatively limited information regarding the active ingredients of food products and their bioavailability, structure-activity relationship and cellular targets, a diet rich in vasoprotective natural products is an attractive approach for promoting healthy aging.

1. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
2. Vanhoutte, P.M. and C.M. Boulanger, *Endothelium-dependent responses in hypertension*. *Hypertens Res*, 1995. **18**(2): p. 87-98.
3. Lerman, A. and A.M. Zeiher, *Endothelial Function*. *Circulation*, 2005. **111**(3): p. 363-368.
4. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial Function and Dysfunction*. *Circulation*, 2007. **115**(10): p. 1285-1295.
5. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease*. *Acta Physiol*, 2009. **196**(2): p. 193-222.
6. Dal-Ros, S., et al., *Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: role of NADPH oxidase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **404**(2): p. 743-9.
7. Idris Khodja, N., et al., *Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e32039.
8. Griendling, K.K. and G.A. FitzGerald, *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies*. *Circulation*, 2003. **108**(17): p. 2034-40.
9. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 494-501.
10. Yeboah, J., et al., *Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study*. *Circulation*, 2007. **115**(18): p. 2390-7.
11. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. *Lancet*, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
12. Chiva-Blanch, G., et al., *Effects of Wine, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease Risk Factors: Evidences from Human Studies*. *Alcohol and Alcoholism*, 2013. **48**(3): p. 270-277.
13. Boban, M., et al., *Red wine induced modulation of vascular function: separating the role of polyphenols, ethanol, and urates*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47**(5): p. 695-701.
14. Cuevas, A.M., et al., *A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers*. *Lipids*, 2000. **35**(2): p. 143-8.
15. Whelan, A.P., et al., *Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease*. *Intern Med J*, 2004. **34**(5): p. 224-8.
16. Karatzi, K., et al., *Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease*. *Coron Artery Dis*, 2004. **15**(8): p. 485-90.
17. Coimbra, S.R., et al., *The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients*. *Braz J Med Biol Res*, 2005. **38**(9): p. 1339-47.
18. Agewall, S., et al., *Does a glass of red wine improve endothelial function?* *Eur Heart J*, 2000. **21**(1): p. 74-8.
19. Hashimoto, M., et al., *Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery*. *Am J Cardiol*, 2001. **88**(12): p. 1457-60, A9.
20. Papamichael, C., et al., *Combined acute effects of red wine consumption and cigarette smoking on haemodynamics of young smokers*. *J Hypertens*, 2006. **24**(7): p. 1287-92.
21. Papamichael, C., et al., *Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers*. *Am Heart J*, 2004. **147**(2): p. E5.
22. Chiva-Blanch, G., et al., *Dealcoholized red wine decreases systolic and diastolic blood pressure and increases plasma nitric oxide: short communication*. *Circ Res*, 2012. **111**(8): p. 1065-8.
23. Droste, D.W., et al., *A daily glass of red wine and lifestyle changes do not affect arterial blood pressure and heart rate in patients with carotid arteriosclerosis after 4 and 20 weeks*. *Cerebrovasc Dis Extra*, 2013. **3**(1): p. 121-9.
24. de Moura, R.S., et al., *Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. **44**(3): p. 302-9.

25. Musial, D.C., et al., *Chronic treatment with red wine modulates the purinergic neurotransmission and decreases blood pressure in hypertensive SHR and diabetic-STZ rats*. *Int J Food Sci Nutr*, 2015. **66**(5): p. 579-86.
26. Lopez-Sepulveda, R., et al., *Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*, 2008. **51**(4): p. 1088-95.
27. Mizutani, K., et al., *Extract of wine phenolics improves aortic biomechanical properties in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP)*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1999. **45**(1): p. 95-106.
28. Jimenez, R., et al., *Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(3): p. 462-73.
29. Sarr, M., et al., *Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(4): p. 794-802.
30. Chan, S.L., et al., *Impact of chronic treatment with red wine polyphenols (RWP) on cerebral arterioles in the spontaneous hypertensive rat*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008. **51**(3): p. 304-10.
31. Chan, S.-L., C. Capdeville-Atkinson, and J. Atkinson, *Red Wine Polyphenols Improve Endothelium-dependent Dilation in Rat Cerebral Arterioles*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2008. **51**(6): p. 553-558.
32. Lopez Andres, N., et al., *Increased microparticle production and impaired microvascular endothelial function in aldosterone-salt-treated rats: protective effects of polyphenols*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e39235.
33. Dal-Ros, S., et al., *Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **419**(2): p. 381-7.
34. Fitzpatrick, D.F., S.L. Hirschfield, and R.G. Coffey, *Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(2 Pt 2): p. H774-8.
35. Andriambeloson, E., et al., *Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta*. *Br J Pharmacol*, 1997. **120**(6): p. 1053-8.
36. Schini-Kerth, V.B., et al., *Polyphenol-induced endothelium-dependent relaxations role of NO and EDHF*. *Adv Pharmacol*, 2010. **60**: p. 133-75.
37. Ndiaye, M., et al., *Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery*. *FASEB J*, 2005. **19**(3): p. 455-7.
38. Auger, C., et al., *The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **393**(1): p. 162-7.
39. Auger, C., et al., *The red wine extract-induced activation of endothelial nitric oxide synthase is mediated by a great variety of polyphenolic compounds*. *Mol Nutr Food Res*, 2010. **54 Suppl 2**: p. S171-83.
40. Martin, S., et al., *Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production*. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(6): p. 1579-87.
41. Chalopin, M., et al., *Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8554.
42. Kane, M.O., et al., *Role of gender and estrogen receptors in the rat aorta endothelium-dependent relaxation to red wine polyphenols*. *Vascul Pharmacol*, 2009. **51**(2-3): p. 140-6.
43. Ndiaye, M., et al., *Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **310**(2): p. 371-7.

44. Burns, J., et al., *Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(2): p. 220-30.
45. Flesch, M., A. Schwarz, and M. Bohm, *Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 2): p. H1183-90.
46. Andriambeloson, E., et al., *Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta*. J Nutr, 1998. **128**(12): p. 2324-33.
47. Auger, C., et al., *Great heterogeneity of commercial fruit juices to induce endothelium-dependent relaxations in isolated porcine coronary arteries: role of the phenolic content and composition*. J Med Food, 2015. **18**(1): p. 128-36.
48. Auger, C., et al., *Fruit juice-induced endothelium-dependent relaxations in isolated porcine coronary arteries: evaluation of different fruit juices and purees and optimization of a red fruit juice blend*. Food Funct, 2011. **2**(5): p. 245-50.
49. Alhosin, M., et al., *Redox-Sensitive Up-Regulation of eNOS by Purple Grape Juice in Endothelial Cells: Role of PI3-Kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and FoxO3a*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57883.
50. Peng, N., et al., *Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(3): p. R771-5.
51. Al-Awwadi, N.A., et al., *Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(1): p. 151-7.
52. Shaughnessy, K.S., et al., *Diets containing blueberry extract lower blood pressure in spontaneously hypertensive stroke-prone rats*. Nutr Res, 2009. **29**(2): p. 130-8.
53. Maher, M.A., et al., *Cranberry juice induces nitric oxide-dependent vasodilation in vitro and its infusion transiently reduces blood pressure in anesthetized rats*. J Med Food, 2000. **3**(3): p. 141-7.
54. de Nigris, F., et al., *The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats*. Nitric Oxide, 2007. **17**(1): p. 50-4.
55. Aviram, M. and L. Dornfeld, *Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure*. Atherosclerosis, 2001. **158**(1): p. 195-8.
56. Aviram, M., et al., *Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation*. Clin Nutr, 2004. **23**(3): p. 423-33.
57. Park, Y.K., J.S. Kim, and M.H. Kang, *Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: double-blind, placebo controlled intervention trial*. Biofactors, 2004. **22**(1-4): p. 145-7.
58. Chou, E.J., et al., *Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease*. Am J Cardiol, 2001. **88**(5): p. 553-5.
59. Lekakis, J., et al., *Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2005. **12**(6): p. 596-600.
60. Stensvold, I., et al., *Tea consumption. relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality*. Prev Med, 1992. **21**(4): p. 546-53.
61. Greyling, A., et al., *The effect of black tea on blood pressure: a systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103247.
62. Duffy, S.J., et al., *Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease*. Circulation, 2001. **104**(2): p. 151-6.

63. Hodgson, J.M., et al., *Regular ingestion of black tea improves brachial artery vasodilator function*. Clin Sci (Lond), 2002. **102**(2): p. 195-201.
64. Jane-Wit, D. and H.J. Chun, *Mechanisms of dysfunction in senescent pulmonary endothelium*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(3): p. 236-41.
65. Onakpoya, I., et al., *The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014. **24**(8): p. 823-36.
66. Grassi, D., et al., *Black tea consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation in healthy males*. J Hypertens, 2009. **27**(4): p. 774-81.
67. Jochmann, N., et al., *The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea*. Br J Nutr, 2008. **99**(4): p. 863-8.
68. Alexopoulos, N., et al., *The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2008. **15**(3): p. 300-5.
69. Ras, R.T., P.L. Zock, and R. Draijer, *Tea consumption enhances endothelial-dependent vasodilation; a meta-analysis*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e16974.
70. Kim, J.A., et al., *Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13736-45.
71. Anter, E., et al., *Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46637-43.
72. Anter, E., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor alpha-dependent pathway in response to black tea polyphenols*. Circ Res, 2005. **96**(10): p. 1072-8.
73. Li, Y., et al., *Green tea polyphenols down-regulate caveolin-1 expression via ERK1/2 and p38MAPK in endothelial cells*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(12): p. 1021-7.
74. Kurita, I., et al., *Hydroxylation of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate at 3", but not 4", is essential for the PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO synthase in endothelial cells and relaxation of coronary artery rings*. Food Funct, 2013. **4**(2): p. 249-57.
75. McCullough, M.L., et al., *Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47 Suppl 2**: p. S103-9; discussion 119-21.
76. Corti, R., et al., *Cocoa and cardiovascular health*. Circulation, 2009. **119**(10): p. 1433-41.
77. Hooper, L., et al., *Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(3): p. 740-51.
78. Desch, S., et al., *Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis*. Am J Hypertens, 2010. **23**(1): p. 97-103.
79. Taubert, D., R. Roesen, and E. Schomig, *Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis*. Arch Intern Med, 2007. **167**(7): p. 626-34.
80. Faridi, Z., et al., *Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: a randomized controlled crossover trial*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(1): p. 58-63.
81. Taubert, D., et al., *Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension*. JAMA, 2003. **290**(8): p. 1029-30.
82. Schroeter, H., et al., *(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(4): p. 1024-9.
83. Heiss, C., et al., *Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47 Suppl 2**: p. S128-35; discussion S172-6.
84. Xiong, X.J., et al., *Garlic for hypertension: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Phytomedicine, 2015. **22**(3): p. 352-61.
85. Kwak, J.S., et al., *Garlic powder intake and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials*. Nutr Res Pract, 2014. **8**(6): p. 644-54.
86. Sharifi, A.M., R. Darabi, and N. Akbarloo, *Investigation of antihypertensive mechanism of garlic in 2K1C hypertensive rat*. J Ethnopharmacol, 2003. **86**(2-3): p. 219-24.

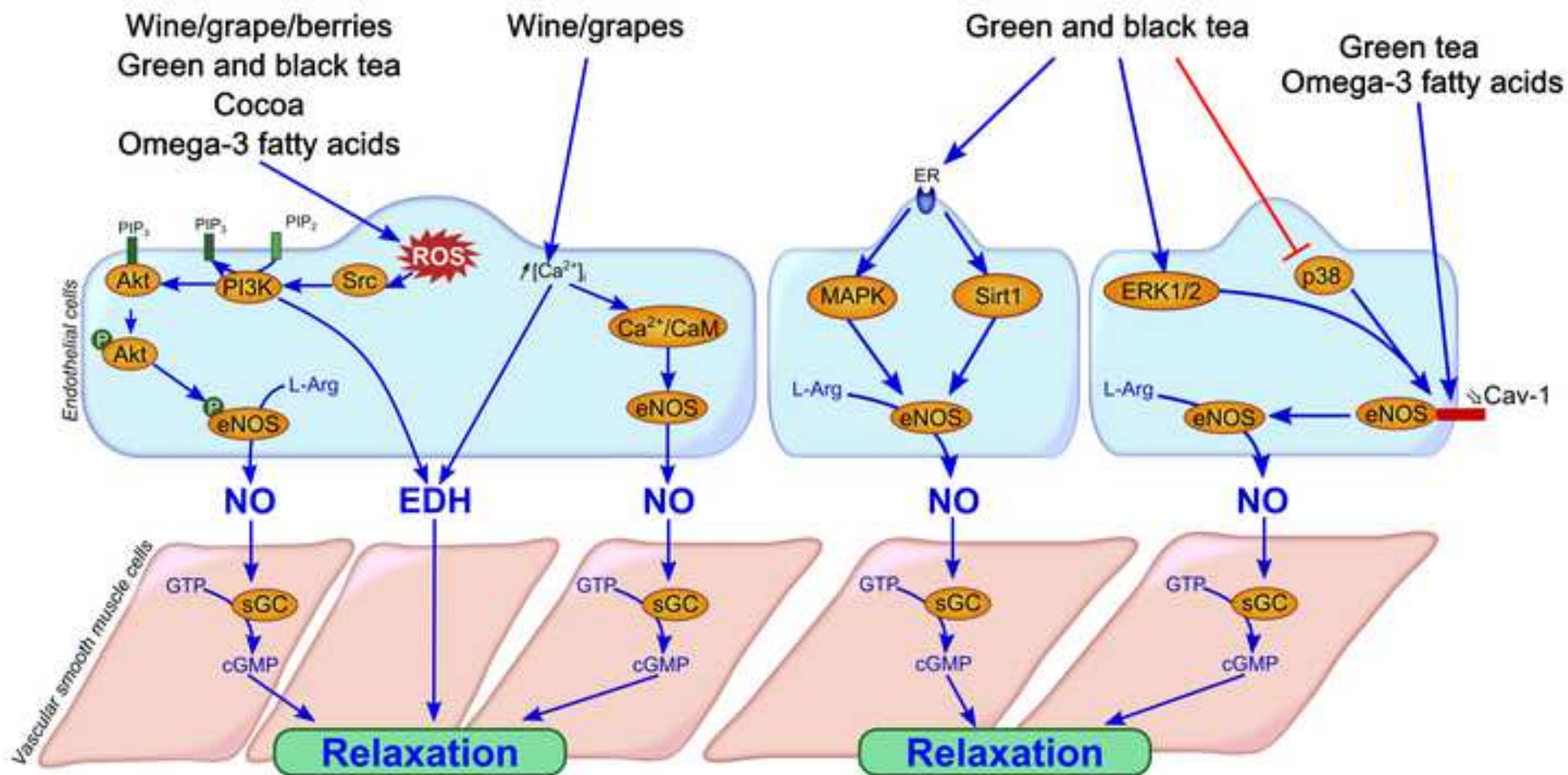
87. Ali, M., M. Thomson, and M. Afzal, *Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance*. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2000. **62**(2): p. 55-73.
88. Somova, L.O., et al., *Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension*. Phytomedicine, 2003. **10**(2-3): p. 115-21.
89. McCarty, M.F., J.J. DiNicolantonio, and J.H. O'Keefe, *Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health*. Open Heart, 2015. **2**(1): p. e000262.
90. Diwan, V., H. Poudyal, and L. Brown, *Piperine attenuates cardiovascular, liver and metabolic changes in high carbohydrate, high fat-fed rats*. Cell Biochem Biophys, 2013. **67**(2): p. 297-304.
91. Nyadjeu, P., et al., *Acute and chronic antihypertensive effects of Cinnamomum zeylanicum stem bark methanol extract in L-NAME-induced hypertensive rats*. BMC Complement Altern Med, 2013. **13**: p. 27.
92. Preuss, H.G., et al., *Whole cinnamon and aqueous extracts ameliorate sucrose-induced blood pressure elevations in spontaneously hypertensive rats*. J Am Coll Nutr, 2006. **25**(2): p. 144-50.
93. Wainstein, J., et al., *Dietary cinnamon supplementation and changes in systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes*. J Med Food, 2011. **14**(12): p. 1505-10.
94. Bratz, I.N., et al., *Impaired capsaicin-induced relaxation of coronary arteries in a porcine model of the metabolic syndrome*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2008. **294**(6): p. H2489-96.
95. Ku, D.D., et al., *Garlic and its active metabolite allicin produce endothelium- and nitric oxide-dependent relaxation in rat pulmonary arteries*. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 2002. **29**(1-2): p. 84-91.
96. Xu, X., et al., *Activation of transient receptor potential vanilloid 1 by dietary capsaicin delays the onset of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2011. **42**(11): p. 3245-51.
97. Ching, L.C., et al., *Molecular mechanisms of activation of endothelial nitric oxide synthase mediated by transient receptor potential vanilloid type 1*. Cardiovascular research, 2011. **91**(3): p. 492-501.
98. Marchioli, R., et al., *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1897-903.
99. Albert, C.M., et al., *Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death*. N Engl J Med, 2002. **346**(15): p. 1113-8.
100. Alter, P. and H. Rupp, *Letter by Alter and Rupp regarding article, "OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction"*. Circulation, 2011. **124**(1): p. e23; author reply e24-5.
101. Abeywardena, M.Y. and R.J. Head, *Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function*. Cardiovasc Res, 2001. **52**(3): p. 361-71.
102. Bhatnagar, D. and P.N. Durrington, *Omega-3 fatty acids: their role in the prevention and treatment of atherosclerosis related risk factors and complications*. Int J Clin Pract, 2003. **57**(4): p. 305-14.
103. Wang, Q., et al., *Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Atherosclerosis, 2012. **221**(2): p. 536-43.
104. Tagawa, H., et al., *Long-term treatment with eicosapentaenoic acid augments both nitric oxide-mediated and non-nitric oxide-mediated endothelium-dependent forearm vasodilatation in patients with coronary artery disease*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33**(4): p. 633-40.

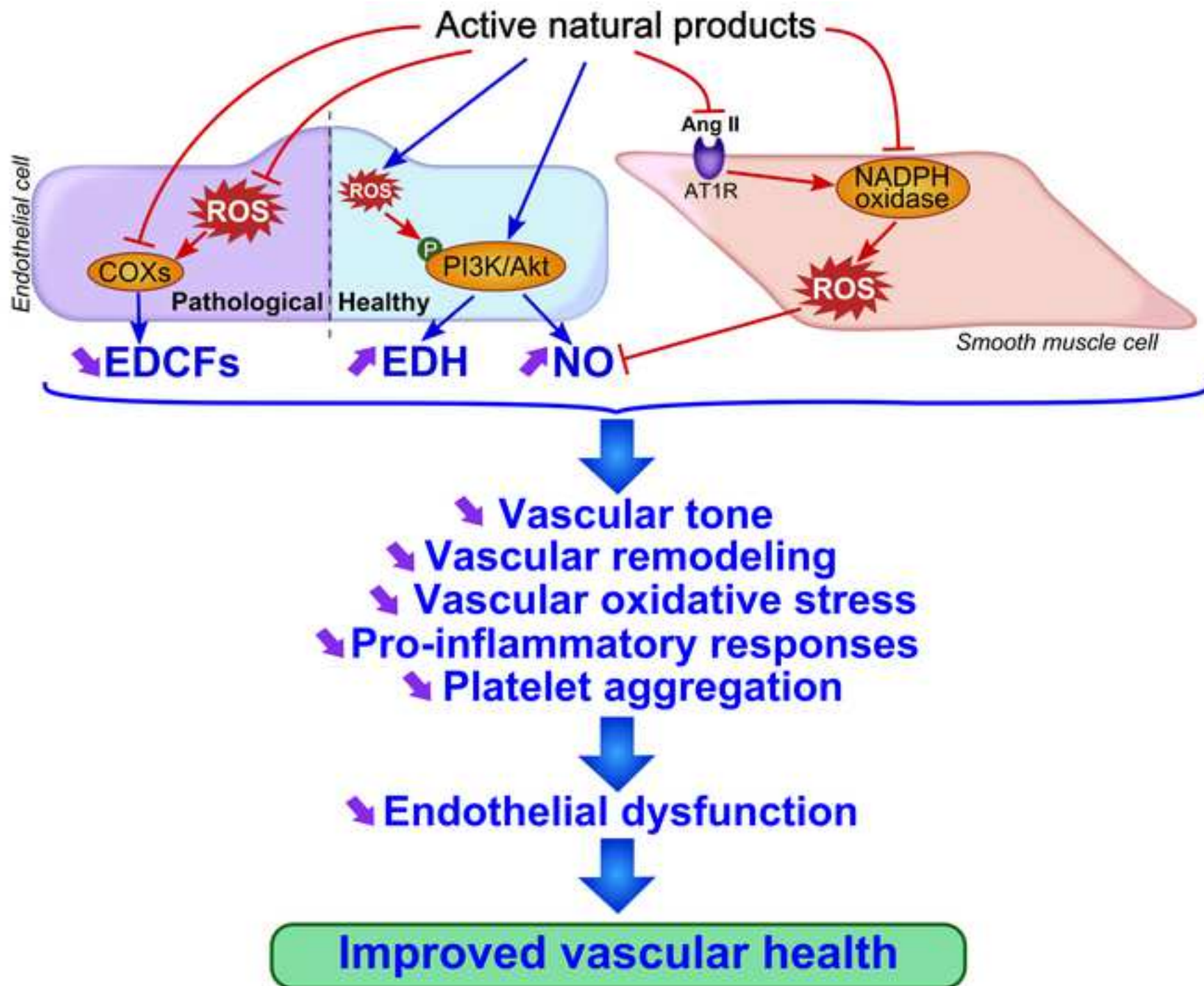
105. Shimokawa, H. and P.M. Vanhoutte, *Dietary cod-liver oil improves endothelium-dependent responses in hypercholesterolemic and atherosclerotic porcine coronary arteries*. *Circulation*, 1988. **78**(6): p. 1421-30.
106. Komori, K., H. Shimokawa, and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent relaxation in response to aggregating platelets in porcine femoral veins and its modulation by diet*. *Circulation*, 1989. **80**(2): p. 401-9.
107. Shimokawa, H., et al., *Effects of dietary supplementation with cod-liver oil on endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries*. *Circulation*, 1987. **76**(4): p. 898-905.
108. Zgheel, F., et al., *Redox-Sensitive Induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs Pathways Activate eNOS in Response to EPA:DHA 6:1*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e105102.
109. Li, Q., et al., *Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase*. *Biochimie*, 2007. **89**(1): p. 169-77.
110. Gortan Cappellari, G., et al., *Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause*. *J Nutr Biochem*, 2013. **24**(1): p. 371-9.
111. Losurdo, P., et al., *Supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents increase in arterial stiffness after experimental menopause*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2014. **19**(1): p. 114-20.
112. Stirban, A., et al., *Effects of n-3 fatty acids on macro- and microvascular function in subjects with type 2 diabetes mellitus*. *Am J Clin Nutr*, 2010. **91**(3): p. 808-13.
113. Fleischhauer, F.J., W.D. Yan, and T.A. Fischell, *Fish oil improves endothelium-dependent coronary vasodilation in heart transplant recipients*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(4): p. 982-9.

Figure legends

Figure 1: Mechanisms involved in the regulation of vascular tone by active dietary natural products. The stimulation of the endothelial formation of NO and EDH is mainly due to the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway, the Ca²⁺/CaM signaling pathway, and several other additional pathways as indicated. Abbreviations: Ca²⁺/CaM, calcium/calmodulin complex; [Ca²⁺]_i, free intracellular calcium concentration; eNOS, endothelial NO synthase; sGC, soluble guanylyl cyclase; cGMP, cyclic guanosine 3',5' monophosphate; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; Cav-1, caveolin 1; ER, estrogen receptor; ERK 1/2, extracellular signal-regulated kinases; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; Sirt1, sirtuin 1.

Figure 2: Active dietary natural products have been shown to improve vascular health by a dual mechanism: activation of endothelial cells promoting vasorelaxation and inhibition of vasocontractile responses, and reduction of the level of vascular oxidative stress in pathological and old arteries. Abbreviations: Ang II, angiotensin II; AT1R, Ang II type 1 receptor; COXs, cyclooxygenases; EDCFs, endothelium-derived contractile factors; EDH, endothelium-dependent hyperpolarization; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species.





RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe Y, Tatsumi K, Sugito K, Ikeda Y, Kimura H and Kuriyama T (2001) Effects of inhaled prostacyclin analogue on chronic hypoxic pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **37**:239-251.
- Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G and Begaud B (1996) Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* **335**:609-616.
- Abeywardena MY and Head RJ (2001) Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovasc Res* **52**:361-371.
- Aburima A, Wraith KS, Raslan Z, Law R, Magwenzi S and Naseem KM (2013) cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway. *Blood* **122**:3533-3545.
- Adkins Y and Kelley DS (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutri Biochem* **21**:781-792.
- Agapitov AV and Haynes WG (2002) Role of endothelin in cardiovascular disease. *JRAAS* **3**:1-15.
- Alter P and Rupp H (2011) Letter by Alter and Rupp regarding article, "OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction". *Circ* **124**:24-25.
- Archer S and Rich S (2000) Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation* **102**:2781-2791.
- Auger C, Said A, Nguyen PN, Chabert P, Idris-Khodja N and Schini-Kerth VB (2016) Potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health. *J Cardiovasc Pharmacol* **68**:11-8.
- Balanza-Martinez V, Fries GR, Colpo GD, Silveira PP, Portella AK, Tabares-Seisdedos R and Kapczinski F (2011) Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* **11**:1029-1047.
- Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S and Serhan CN (2005) Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* **174**:4345-4355.
- Barman SA, Chen F, Su Y, Dimitropoulou C, Wang Y, Catravas JD, Han W, Orfi L, Szantai-Kis C, Keri G, Szabadkai I, Barabutis N, Rafikova O, Rafikov R, Black SM, Jonigk D, Giannis A, Asmis R, Stepp DW, Ramesh G and Fulton DJ (2014) NADPH oxidase 4 is expressed in pulmonary artery adventitia and contributes to hypertensive vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**:1704-1715.

- Barst RJ, Chung L, Zamanian RT, Turner M and McGoon MD (2013) Functional class improvement and 3-year survival outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension in the REVEAL Registry. *Chest* **144**:160-168.
- Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, Koerner SK, Langleben D, Keller CA, Murali S, Uretsky BF, Clayton LM, Jobsis MM, Blackburn SD, Shortino D, Crow JW and Primary Pulmonary Hypertension Study G (1996) A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **334**:296-301.
- Bedard E, Dimopoulos K and Gatzoulis MA (2009) Has there been any progress made on pregnancy outcomes among women with pulmonary arterial hypertension? *Eur Heart J* **30**:256-265.
- Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, Frantz RP, Foreman AJ, Coffey CS, Frost A, Barst RJ, Badesch DB, Elliott CG, Liou TG and McGoon MD (2010) Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circ* **122**:164-172.
- Benzing A, Mols G, Brieschal T and Geiger K (1997) Hypoxic pulmonary vasoconstriction in nonventilated lung areas contributes to differences in hemodynamic and gas exchange responses to inhalation of nitric oxide. *Int Anesthesiol Clin* **86**:1254-1261.
- Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A and Voelkel NF (2009) The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* **135**:794-804.
- Boisrame-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V and Meziani F (2013) Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* **11**:150-160.
- Boisrame-Helms J, Toti F, Hasselmann M and Meziani F (2015) Lipid emulsions for parenteral nutrition in critical illness. *Prog Lipid Res* **60**:1-16.
- Bossone E, Citro R, Blasi F and Allegra L (2007) Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: An essential tool. *Chest* **131**:339-341.
- Brittain EL, Hemnes AR, Keebler M, Lawson M, Byrd BF, 3rd and Disalvo T (2012) Right ventricular plasticity and functional imaging. *Pulm Circ* **2**:309-326.
- Budhiraja R, Tuder RM and Hassoun PM (2004) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circ* **109**:159-165.
- Calder PC (2003) N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids* **38**:343-352.
- Calder PC (2011) Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol* **668**:50-58.
- Calder PC (2012) Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* **142**:592-599.
- Calder PC (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* **75**:645-662.
- Calder PC, Jensen GL, Koletzko BV, Singer P and Wanten GJ (2010) Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions. *Intensive Care Med* **36**:735-749.

- Cao G, Liu C, Wan Z, Liu K, Sun H, Sun X, Tang M, Bing W, Wu S, Pang X and Zhang X (2015) Combined hypoxia inducible factor-1alpha and homogeneous endothelial progenitor cell therapy attenuates shunt flow-induced pulmonary arterial hypertension in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* **150**:621-632.
- Cave AC, Manche A, Derias NW and Hearse DJ (1993) Thromboxane A2 mediates pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in the rabbit. *J Thorac Cardiovasc Surg* **106**:959-967.
- Chambrier C, Lauerjat M and Boulétreau P (2006) Émulsions lipidiques: indication des différentes émulsions lipidiques. *Nutr Clin Metabol* **20**:73-78.
- Champion HC, Michelakis ED and Hassoun PM (2009) Comprehensive invasive and noninvasive approach to the right ventricle-pulmonary circulation unit: state of the art and clinical and research implications. *Circ* **120**:992-1007.
- Chan SY and Loscalzo J (2008) Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol* **44**:14-30.
- Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F and Rubin LJ (2001) Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* **358**:1119-1123.
- Channick RN, Sitbon O, Barst RJ, Manes A and Rubin LJ (2004) Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**:62-67.
- Chaumais MC, Perrin S, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M and Montani D (2013) Pharmacokinetic evaluation of sildenafil as a pulmonary hypertension treatment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **9**:1193-1205.
- Chin KM and Rubin LJ (2008) Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **51**:1527-1538.
- Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI, International Society of H and Lung T (2012) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *The Journal of heart and lung transplantation : J Heart Lung Transplant* **31**:1073-1086.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM and Loyd JE (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **327**:70-75.
- Chu D, Sullivan CC, Du L, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Weitzman MD, Jamieson SW and Thistlethwaite PA (2004) A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin-1. *Ann Thorac Surg* **77**:449-456.
- Clarke SD and Jump DB (1993) Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog Lipid Res* **32**:139-149.
- Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, Stanton KC, Wheeler LA, Phillips JA, 3rd, Loyd JE and Nichols WC (2006) High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **174**:590-598.
- Copple BL, Rondelli CM, Maddox JF, Hoglen NC, Ganey PE and Roth RA (2004) Modes of cell death in rat liver after monocrotaline exposure. *J Toxicol Sci* **77**:172-182.

- Cottin SC, Sanders TA and Hall WL (2011) The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc* **70**:215-231.
- Cottin V, Frachon I and Simonneau G (2009) Nouvelle classification de l'HTAP. *Rev Mal Respir* **1**:204-207.
- Crosswhite P and Sun Z (2010) Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *J Hypertens* **28**:201-212.
- Dao P, Montani D, Duong-Quy S and Dinh-Xuan AT (2006) [Cellular signalling pathways and pathophysiology of pulmonary arterial hypertension]. *Rev Mal Respir* **23**:375-383.
- Davidson MH (2013) Omega-3 fatty acids: new insights into the pharmacology and biology of docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Curr Opin Lipidol* **24**:467-474.
- Davignon J and Ganz P (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circ* **109**:27-32.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Jr. and Libby P (1994) The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* **14**:1829-1836.
- Deckelbaum RJ, Calder PC and Carpentier YA (2004) Using different intravenous lipids: underutilized therapeutic approaches? *Curr Opin Clin Nutr Metab care* **7**:113-115.
- Degriolamo C, Kelley KL, Wilson MD and Rudel LL (2010) Dietary n-3 LCPUFA from fish oil but not alpha-linolenic acid-derived LCPUFA confers atheroprotection in mice. *J Lipid Res* **51**:1897-1905.
- DeMarco VG, Habibi J, Whaley-Connell AT, Schneider RI, Heller RL, Bosanquet JP, Hayden MR, Delcour K, Cooper SA, Andresen BT, Sowers JR and Dellsperger KC (2008) Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**:2659-2668.
- Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J and Dellsperger KC (2010) Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol* **2**:316-324.
- Dikalov S, Griendling KK and Harrison DG (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertens* **49**:717-727.
- Dorfmüller P, Chaumais MC, Giannakouli M, Durand-Gasselín I, Raymond N, Fadel E, Mercier O, Charlotte F, Montani D, Simonneau G, Humbert M and Perros F (2011) Increased oxidative stress and severe arterial remodeling induced by permanent high-flow challenge in experimental pulmonary hypertension. *Respir Res* **12**:119.
- Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K and Humbert M (2003) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **22**:358-363.
- Dumitrascu R, Kulcke C, Königshoff M, Kouri F, Yang X, Morrell N, Ghofrani HA, Weissmann N, Reiter R, Seeger W, Grimminger F, Eickelberg O, Schermuly RT and Pullamsetti SS (2011) Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J* **37**:1104-1118.
- Duong-Quy S, Bei Y, Liu Z and Dinh-Xuan AT (2013) Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* **137**:352-364.

- Duong-Quy S, Riviere S, Bei Y, Duong-Ngo C, Le-Dong NN, Hua-Huy T and Dinh-Xuan AT (2012) [Pulmonary hypertension: from molecular pathophysiology to haemodynamic abnormalities]. *Rev Mal Respir* **29**:956-970.
- Eddahibi S and Adnot S (2001) Endothelins and pulmonary hypertension, what directions for the near future? *Eur Respir J* **18**:1-4.
- El Chami H and Hassoun PM (2012) Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* **55**:218-228.
- Ewert R, Opitz CF, Wensel R, Winkler J, Halank M and Felix SB (2007) Continuous intravenous iloprost to revert treatment failure of first-line inhaled iloprost therapy in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Clin Res Cardiol* **96**:211-217.
- Franco V (2012) Right ventricular remodeling in pulmonary hypertension. *Heart failure clinics* **8**:403-412.
- Furchgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**:373-376.
- Galie N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon MD, Keogh AM, Frost AE, Zwicke D, Naeije R, Shapiro S, Olschewski H and Rubin LJ (2005) Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **46**:529-535.
- Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J-L, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S and Gibbs JS (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* **30**:2493-2537.
- Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ and Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension RD-BP-CMESG (2008a) Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circ* **117**:3010-3019.
- Galie N, Rubin L, Hoeper M, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer G, Chiossi E, Kusic-Pajic A and Simonneau G (2008b) Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **371**:2093-2100.
- Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Simonneau G, Wilkins MR, Fritsch A, Neuser D, Weimann G, Wang C and Group C-S (2013a) Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **369**:319-329.
- Ghofrani HA, Galie N, Grimminger F, Grunig E, Humbert M, Jing ZC, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ and Group P-S (2013b) Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **369**:330-340.
- Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadas B, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W and Grimminger F (2004) Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* **44**:1488-1496.
- Giaid A and Saleh D (1995) Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **333**:214-221.

- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP and Stewart DJ (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **328**:1732-1739.
- Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF and Bogaard HJ (2012) The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**:L363-369.
- Gordon JL and Martin W (1983) Stimulation of endothelial prostacyclin production plays no role in endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. *Br J Pharmacol* **80**:179-186.
- Gosmanov AR, Smiley DD, Peng L, Siquiera J, Robalino G, Newton C and Umpierrez GE (2012) Vascular effects of intravenous intralipid and dextrose infusions in obese subjects. *Metabol* **61**:1370-1376.
- Goulet O, Antebi H, Wolf C, Talbotec C, Alcindor LG, Corriol O, Lamor M and Colomb-Jung V (2010) A new intravenous fat emulsion containing soybean oil, medium-chain triglycerides, olive oil, and fish oil: a single-center, double-blind randomized study on efficacy and safety in pediatric patients receiving home parenteral nutrition. *JPEN* **34**:485-495.
- Greyson CR (2008) Pathophysiology of right ventricular failure. *Crit Care Med* **36**:S57-65.
- Grover RF (2014) The paradox of hypoxic pulmonary hypertension (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* **4**:151-157.
- Gryglewski RJ, Bunting S, Moncada S, Flower RJ and Vane JR (1976) Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **12**:685-713.
- Gryglewski RJ, Chlopicki S, Uracz W and Marcinkiewicz E (2001) Significance of endothelial prostacyclin and nitric oxide in peripheral and pulmonary circulation. *Med Sci Monit* **7**:1-16.
- Guesnet P, Alessandri J-M, Astorg P, Pifferi F and Lavialle M (2005) Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Lipides* **12**:333-343.
- Guibert C, Savineau JP, Crevel H, Marthan R and Rousseau E (2005) Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. *Br J Pharmacol* **146**:692-701.
- Guihaire J (2014) Remodelage du Ventricule Droit dans l'Hypertension Pulmonaire Chronique Expérimentale, Thèse Université Paris Sud-Paris XI.
- Gupta S, Torres F, Bollineni S, Mohanka M and Kaza V (2015) Left Ventricular Dysfunction After Lung Transplantation for Pulmonary Arterial Hypertension. *Transplant Proc* **47**:2732-2736.
- Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN and Murphy DJ (2008) Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circ* **117**:1436-1448.
- Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, Elliott CG, Robbins IM, Olschewski H, McLaughlin V, Gruenig E, Kermeen F, Halme M, Raisanen-Sokolowski A, Laitinen T, Morrell NW and Trembath RC (2003) Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med genet* **40**:865-871.

- Hasselmann M, Delabranche X and Kummerlen C (2009) Intérêt des lipides modifiés chez le patient de réanimation. *Anaesthesiol Reanim* **18**:501-505.
- Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX and Humbert M (2009) Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* **54**:S10-19.
- Hathaway DR, Konicki MV and Coolican SA (1985) Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *J Mol Cell Cardiol* **17**:841-850.
- Henriques-Coelho T, Brandao-Nogueira A, Moreira-Goncalves D, Correia-Pinto J and Leite-Moreira AF (2008) Effects of TNF-alpha blockade in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Rev Port Cardiol* **27**:341-348.
- Herrera EA, Farias JG, Ebensperger G, Reyes RV, Llanos AJ and Castillo RL (2015) Pharmacological approaches in either intermittent or permanent hypoxia: A tale of two exposures. *Pharmacol Res* **101**:94-101.
- Heyland DK, MacDonald S, Keefe L and Drover JW (1998) Total parenteral nutrition in the critically ill patient: a meta-analysis. *Jama* **280**:2013-2019.
- Hilliker KS and Roth RA (1984) Alteration of monocrotaline pyrrole-induced cardiopulmonary effects in rats by hydrallazine, dexamethasone or sulphinpyrazone. *Br J Pharmacol* **82**:375-380.
- Hiram R (2016) Rôle des Résolvines, dérivés trihydroxylés du DHA et de l'EPA, dans la résolution de l'inflammation pour la prévention de l'hypertension artérielle pulmonaire. Thèse Université Sherbrooke, Québec, Canada.
- Hiram R, Rizcallah E, Marouan S, Sirois C, Sirois M, Morin C, Fortin S and Rousseau E (2015) Resolvin E1 normalizes contractility, Ca²⁺ sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF-alpha- and IL-6-pretreated human pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **309**:776-788.
- Hiram R, Rizcallah E, Sirois C, Sirois M, Morin C, Fortin S and Rousseau E (2014) Resolvin D1 reverses reactivity and Ca²⁺ sensitivity induced by ET-1, TNF-alpha, and IL-6 in the human pulmonary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **307**:1547-1558.
- Hiremath J, Thanikachalam S, Parikh K, Shanmugasundaram S, Bangera S, Shapiro L, Pott GB, Vnencak-Jones CL, Arneson C, Wade M, White RJ and Group TS (2010) Exercise improvement and plasma biomarker changes with intravenous treprostinil therapy for pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled trial. *J Heart Lung Transplant* **29**:137-149.
- Ho SY and Nihoyannopoulos P (2006) Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart* **92**:2-13.
- Houeijeh A, Aubry E, Coridon H, Moutagne K, Sfeir R, Deruelle P and Storme L (2011) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation. *Crit Care Med* **39**:1431-1438.
- Houtchens J, Martin D and Klinger JR (2011) Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Med* **2011**.
- Huertas A (2013) De la dysfonction endothéliale à la dysfonction immunitaire dans l'hypertension artérielle pulmonaire: nouvelles cibles d'innovation thérapeutique, Université Paris Sud-Paris XI.

- Huertas A, Perros F, Tu L, Cohen-Kaminsky S, Montani D, Dorfmüller P, Guignabert C and Humbert M (2014) Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay. *Circ* **129**:1332-1340.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF and Rabinovitch M (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**:13S-24S.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jais X, Montani D, Souza R and Simonneau G (2010) Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexia-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circ* **122**:156-163.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E and Simonneau G (2006) Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* **173**:1023-1030.
- Humbert M, Sitbon O and Simonneau G (2002) Les hypertension pulmonaires. *Coeur et Médecine Interne Cohen A & Belmatoug N, Eds ESTEM*:1275-1309.
- Humbert M, Sitbon O and Simonneau G (2004b) Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **351**:1425-1436.
- Imoto K, Kumatani S, Okada M and Yamawaki H (2016) Endostatin is protective against monocrotaline-induced right heart disease through the inhibition of T-type Ca channel. *Eur J Physiol*.
- Ingle KA, Kain V, Goel M, Prabhu SD, Young ME and Halade GV (2015) Cardiomyocyte-specific Bmal1 deletion in mice triggers diastolic dysfunction, extracellular matrix response, and impaired resolution of inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **309**:H1827-1836.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H and Nawata H (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**:1939-1945.
- Jais X, Olsson KM, Barbera JA, Blanco I, Torbicki A, Peacock A, Vizza CD, Macdonald P, Humbert M and Hoeper MM (2012) Pregnancy outcomes in pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Eur Respir J* **40**:881-885.
- Jasmin J-F, Lucas M, Cernacek P and Dupuis J (2001) Effectiveness of a nonselective ETA/B and a selective ETA antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ* **103**:314-318.
- Jeffery TK and Morrell NW (2002) Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* **45**:173-202.
- Jerkic M, Kabir MG, Davies A, Yu LX, McIntyre BA, Husain NW, Enomoto M, Sotov V, Husain M, Henkelman M, Belik J and Letarte M (2011) Pulmonary hypertension in adult Alk1 heterozygous mice due to oxidative stress. *Cardiovasc Res* **92**:375-384.
- Johnson SR, Mehta S and Granton JT (2006) Anticoagulation in pulmonary arterial hypertension: a qualitative systematic review. *Eur Respir J* **28**:999-1004.
- Kaneko FT, Arroliga AC, Dweik RA, Comhair SA, Laskowski D, Oppedisano R, Thomassen MJ and Erzurum SC (1998) Biochemical reaction products of nitric oxide as

- quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **158**:917-923.
- Kar S (2014) Omacor and omega-3 fatty acids for treatment of coronary artery disease and the pleiotropic effects. *Am J Ther* **21**:56-66.
- Katusic ZS, Schugel J, Cosentino F and Vanhoutte PM (1993) Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am J Physiol* **264**:859-864.
- Kay JM, Harris P and Heath D (1967) Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* **22**:176-179.
- Khan EU (2011) Commentary on symptom experience of pulmonary arterial hypertension (PAH) patients. *Clinical Nur Res* **20**:135-143.
- Kido M, Du L, Sullivan CC, Deutsch R, Jamieson SW and Thistlethwaite PA (2005) Gene transfer of a TIE2 receptor antagonist prevents pulmonary hypertension in rodents. *J Thorac Cardiovasc Surg* **129**:268-276.
- Klotz S, Naka Y, Oz MC and Burkhoff D (2005) Biventricular assist device-induced right ventricular reverse structural and functional remodeling. *J Heart Lung Transplant* **24**:1195-1201.
- Kret M and Arora R (2007) Pathophysiological basis of right ventricular remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **12**:5-14.
- Kromhout D, Yasuda S, Geleijnse JM and Shimokawa H (2012) Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? *European heart journal* **33**:436-443.
- Lambert V, Gouadon E, Capderou A, Le Bret E, Ly M, Dinanian S, Renaud JF, Puceat M and Rucker-Martin C (2015) Right ventricular failure secondary to chronic overload in congenital heart diseases: benefits of cell therapy using human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors. *J Thorac Cardiovasc Surg* **149**:708-715 e701.
- Langleben D and Reid LM (1985) Effect of methylprednisolone on monocrotaline-induced pulmonary vascular disease and right ventricular hypertrophy. *Lab Invest* **52**:298-303.
- Leblanc N, Forrest AS, Ayon RJ, Wiwchar M, Angermann JE, Pritchard HA, Singer CA, Valencik ML, Britton F and Greenwood IA (2015) Molecular and functional significance of Ca(2+)-activated Cl(-) channels in pulmonary arterial smooth muscle. *Pulm Circ* **5**:244-268.
- Lekka ME, Liokatis S, Nathanail C, Galani V and Nakos G (2004) The impact of intravenous fat emulsion administration in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **169**:638-644.
- Leopold JA and Maron BA (2016) Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* **17**.
- Li S, Han D, Zhang Y, Xie X, Ke R, Zhu Y, Liu L, Song Y, Yang L and Li M (2016) Activation of AMPK Prevents Monocrotaline-Induced Extracellular Matrix Remodeling of Pulmonary Artery. *Med Sci Monit Basic Res* **22**:27-33.
- Liu Y, Tian HY, Yan XL, Fan FL, Wang WP, Han JL, Zhang JB, Ma Q, Meng Y and Wei F (2013) Serotonin inhibits apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell by pERK1/2 and PDK through 5-HT1B receptors and 5-HT transporters. *Cardiovasc Pathol* **22**:451-457.

- Long L, MacLean MR, Jeffery TK, Morecroft I, Yang X, Rudarakanchana N, Southwood M, James V, Trembath RC and Morrell NW (2006) Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res* **98**:818-827.
- Lorente-Cebrian S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Martinez JA and Moreno-Aliaga MJ (2013) Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem* **69**:633-651.
- Loscalzo J (2001) Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* **88**:756-762.
- Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F and Sliwa K (2013) A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulm Circ* **3**:739-756.
- MacLean MR, Herve P, Eddahibi S and Adnot S (2000) 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol* **131**:161-168.
- Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Arons E, Christou HA and Khalil RA (2010) Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **332**:455-462.
- Mann DL (2004) Basic mechanisms of left ventricular remodeling: the contribution of wall stress. *J Card Fail* **10**:S202-206.
- McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Pulido T, Rich S, Rosenkranz S, Suissa S and Humbert M (2013) Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol* **62**:D51-59.
- McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J, American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus D, American Heart Association A, American College of Chest Physicians P, American Thoracic Society I and Pulmonary Hypertension A (2009) ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol* **53**:1573-1619.
- McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R and Humbert M (2015) Management of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **65**:1976-1997.
- McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, Barst RJ, Black C, Galie N, Rainisio M, Simonneau G and Rubin LJ (2005) Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **25**:244-249.
- Mereles D, Ehlken N, Kreuzer S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, Meyer FJ, Karger G, Buss J, Juenger J, Holzapfel N, Opitz C, Winkler J, Herth FF, Wilkens H, Katus HA, Olschewski H and Grunig E (2006) Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circ* **114**:1482-1489.
- Mermis J, Gu H, Xue B, Li F, Tawfik O, Buch S, Bartolome S, O'Brien-Ladner A and Dhillon NK (2011) Hypoxia-inducible factor-1 alpha/platelet derived growth factor axis in HIV-associated pulmonary vascular remodeling. *Respir Res* **12**:103.

- Meyrick B (2001) The pathology of pulmonary artery hypertension. *Clin Chest Med* **22**:393-404.
- Michelakis ED, Reeve HL, Huang JM, Tolarova S, Nelson DP, Weir EK and Archer SL (1997) Potassium channel diversity in vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* **75**:889-897.
- Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y and Goto K (1993) Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* **73**:887-897.
- Molinar-Toribio E, Perez-Jimenez J, Ramos-Romero S, Romeu M, Giralt M, Taltavull N, Munoz-Cortes M, Jauregui O, Mendez L, Medina I and Torres JL (2015) Effect of n-3 PUFA supplementation at different EPA:DHA ratios on the spontaneously hypertensive obese rat model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* **113**:878-887.
- Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Port CD and Solliday NH (1984) Monocrotaline-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **176**:88-94.
- Moncada S and Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**:2002-2012.
- Montani D, Günther S, Dorfmueller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, Jaïs X, Savale L, Artaud-Macari E and Price LC (2013) Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* **8**:1.
- Montani D, Savale L, Natali D, Jaïs X, Herve P, Garcia G, Humbert M, Simonneau G and Sitbon O (2010) Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* **31**:1898-1907.
- Montani D, Souza R, Binkert C, Fischli W, Simonneau G, Clozel M and Humbert M (2007) Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. *Chest* **131**:101-108.
- Mori TA and Beilin LJ (2004) Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep* **6**:461-467.
- Morin C, Fortin S, Cantin AM and Rousseau E (2011a) Docosahexaenoic acid derivative prevents inflammation and hyperreactivity in lung: implication of PKC-Potentiated inhibitory protein for heterotrimeric myosin light chain phosphatase of 17 kD in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**:366-375.
- Morin C, Fortin S, Cantin AM and Rousseau E (2013) MAG-EPA resolves lung inflammation in an allergic model of asthma. *Clin Exp Allergy* **43**:1071-1082.
- Morin C, Fortin S and Rousseau E (2011b) 19,20-EpDPE, a bioactive CYP450 metabolite of DHA monoacylglyceride, decreases Ca(2+)(+) sensitivity in human pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**:1311-1318.
- Morin C, Hiram R, Rousseau E, Blier PU and Fortin S (2014) Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **307**:574-586.
- Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes MM and Rousseau E (2007) Functional effects of 20-HETE on human bronchi: hyperpolarization and relaxation due to BKCa channel activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**:L1037-1044.

- Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E and Rousseau E (2009) Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**:L130-139.
- Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX and Weir EK (2009) Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**:S20-31.
- Motte S, McEntee K and Naeije R (2006) Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* **110**:386-414.
- Mozaffarian D and Wu JH (2011) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol* **58**:2047-2067.
- Mulvany MJ and Aalkjaer C (1990) Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* **70**:921-961.
- Naeije R and Dewachter L (2007) Animal models of pulmonary arterial hypertension. *Rev Mal Respir* **24**:481-496.
- Naeije R and Vachiery JL (2001) Medical therapy of pulmonary hypertension. Conventional therapies. *Clin Chest Med* **22**:517-527.
- Nathanson D, Erdogdu O, Pernow J, Zhang Q and Nystrom T (2009) Endothelial dysfunction induced by triglycerides is not restored by exenatide in rat conduit arteries ex vivo. *Regul Pept* **157**:8-13.
- Newman JH, Wheeler L, Lane KB, Loyd E, Gaddipati R, Phillips JA, 3rd and Loyd JE (2001) Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. *N Engl J Med* **345**:319-324.
- Nogueira-Ferreira R, Moreira-Goncalves D, Silva AF, Duarte JA, Leite-Moreira A, Ferreira R and Henriques-Coelho T (2016) Exercise preconditioning prevents MCT-induced right ventricle remodeling through the regulation of TNF superfamily cytokines. *Int J Cardiol* **203**:858-866.
- Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R and Henriques-Coelho T (2015) Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm Pharmacol Ther* **35**:8-16.
- Norfolk SG, Lederer DJ and Tapson VF (2013) Lung transplantation and atrial septostomy in pulmonary arterial hypertension. *Clin Chest Med* **34**:857-865.
- O'Callaghan DS, Savale L, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G and Humbert M (2011) Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* **8**:526-538.
- Ogawa A, Firth AL, Ariyasu S, Yamadori I, Matsubara H, Song S, Fraidenburg DR and Yuan JX (2013) Thrombin-mediated activation of Akt signaling contributes to pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Physiol Reports* **1**:e00190.
- Olsson KM, Delcroix M, Ghofrani HA, Tiede H, Huscher D, Speich R, Grunig E, Staehler G, Rosenkranz S, Halank M, Held M, Lange TJ, Behr J, Klose H, Claussen M, Ewert R, Opitz CF, Vizza CD, Scelsi L, Vonk-Noordegraaf A, Kaemmerer H, Gibbs JS, Coghlan G, Pepke-Zaba J, Schulz U, Gorenflo M, Pittrow D and Hoeper MM (2014) Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERA). *Circ* **129**:57-65.

- Oudiz RJ, Galie N, Olschewski H, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Harrison BC, Despain D, Dufton C, Rubin LJ and Group AS (2009) Long-term ambrisentan therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**:1971-1981.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, Hirata KI, Hayashi Y, Itoh H and Yokoyama M (2001) Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertens* **37**:322-327.
- Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D and Wallwork J (1991) Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* **338**:1173-1174.
- Pereira S, Shah A, George Fantus I, Joseph JW and Giacca A (2015) Effect of N-acetyl-l-cysteine on insulin resistance caused by prolonged free fatty acid elevation. *J Endocrinol* **225**:1-7.
- Perros F and Humbert M (2007) Bases cellulaires et moléculaires de l'hypertension artérielle pulmonaire, *Ann Cardiol Angeiol* pp 93-S105, Elsevier.
- Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S and Humbert M (2012) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* **141**:210-221.
- Prothero JW and Burton AC (1962) The physics of blood flow in capillaries. II. The capillary resistance to flow. *Biophysical J* **2**:199-212.
- Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, Jansa P, Jing ZC, Le Brun FO, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BK, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G and Investigators S (2013) Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **369**:809-818.
- Pullamsetti SS, Savai R, Janssen W, Dahal BK, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Weissmann N and Schermuly RT (2011) Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clin Microbiol Infect* **17**:7-14.
- Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M and Nicolls MR (2014) Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* **115**:165-175.
- Revermann M, Barbosa-Sicard E, Dony E, Schermuly RT, Morisseau C, Geisslinger G, Fleming I, Hammock BD and Brandes RP (2009) Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Hypertens* **27**:322-331.
- Rich S, Kaufmann E and Levy PS (1992) The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **327**:76-81.
- Roberts JD, Jr., Chiche JD, Weimann J, Steudel W, Zapol WM and Bloch KD (2000) Nitric oxide inhalation decreases pulmonary artery remodeling in the injured lungs of rat pups. *Circ Res* **87**:140-145.
- Roos A (1962) Poiseuille's law and its limitations in vascular systems. *Med thor* **19**:224-238.
- Rubanyi GM, Romero JC and Vanhoutte PM (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250**:1145-1149.
- Rubin LJ (2002) Therapy of pulmonary hypertension: the evolution from vasodilators to antiproliferative agents. *Am J Respir Crit Care Med* **166**:1308-1309.

- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M and Simonneau G (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **346**:896-903.
- Ryan J, Bloch K and Archer SL (2011) Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *Int J Clin Pract Suppl*:15-34.
- Ryan JJ and Archer SL (2014) The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res* **115**:176-188.
- Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, Jiang YP, Chen JJ, Waschek JA and Kort S (2007) Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circ* **115**:1260-1268.
- Sakao S and Tatsumi K (2011) The importance of epigenetics in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir* **16**:1056-1063.
- Scarlett M, McGaw C and Aquart-Stewart A (2009) Pulmonary hypertension: a review of the aetiology, pathophysiology and management. *West Indian Med J* **58**:153-159.
- Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W and Grimminger F (2005a) Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* **115**:2811-2821.
- Schermuly RT, Yilmaz H, Ghofrani HA, Woyda K, Pullamsetti S, Schulz A, Gessler T, Dumitrascu R, Weissmann N, Grimminger F and Seeger W (2005b) Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:358-363.
- Schmitz G and Ecker J (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* **47**:147-155.
- Schultze AE and Roth RA (1998) Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **1**:271-346.
- Schwab JM, Chiang N, Arita M and Serhan CN (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447**:869-874.
- Seferian A and Simonneau G (2014) Hypertension pulmonaire: définition, diagnostic et nouvelle classification. *Presse Med* **43**:935-944.
- Selton-Suty C and Juilliere Y (2009) Non-invasive investigations of the right heart: how and why? *Arch Cardiovasc Dis* **102**:219-232.
- Serhan CN, Chiang N and Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**:349-361.
- Shimokawa H, Aarhus LL and Vanhoutte PM (1988) Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids augment endothelium-dependent relaxation to bradykinin in coronary microvessels of the pig. *Br J Pharmacol* **95**:1191-1196.
- Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, Keogh A, Oudiz R, Frost A, Blackburn SD, Crow JW, Rubin LJ and Treprostinil Study G (2002) Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* **165**:800-804.

- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM and Souza R (2013) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **62**:34-41.
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Kumar RK, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM and Souza R (2014) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Turk Kardiyol Dern Ars* **42**:45-54.
- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N and Souza R (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**:S43-54.
- Simopoulos AP (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* **70**:560S-569S.
- Singer P, Shapiro H, Theilla M, Anbar R, Singer J and Cohen J (2008) Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med* **34**:1580-1592.
- Sitbon O, Humbert M and Simonneau G (2002) Primary pulmonary hypertension: Current therapy. *Prog Cardiovasc Dis* **45**:115-128.
- Sitbon O, Savale L, Jais X, Montani D, Humbert M and Simonneau G (2014) Treatment of pulmonary arterial hypertension. *Presse Med* **43**:981-993.
- Smith JB (1981) Prostaglandins and platelet aggregation. *Acta Med Scand Suppl* **651**:91-99.
- Song Y, Coleman L, Shi J, Beppu H, Sato K, Walsh K, Loscalzo J and Zhang YY (2008) Inflammation, endothelial injury, and persistent pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**:677-690.
- Spector AA (1999) Essentiality of fatty acids. *Lipids* **34**:1-3.
- Steer P, Basu S, Lithell H, Vessby B, Berne C and Lind L (2003) Acute elevations of medium- and long-chain fatty acid have different impacts on endothelium-dependent vasodilation in humans. *Lipids* **38**:15-19.
- Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B and Baron AD (1997) Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest* **100**:1230-1239.
- Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ and McMurtry IF (2009a) Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**:1013-1032.
- Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P and Langleben D (1991) Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Int Med* **114**:464-469.
- Stool EW, Mullins CB, Leshin SJ and Mitchell JH (1974) Dimensional changes of the left ventricle during acute pulmonary arterial hypertension in dogs. *Am J Cardiol* **33**:868-875.
- Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, Montani D, Souza R, Simonneau G, Soubrier F and Humbert M (2008) Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med* **177**:1377-1383.

- Sztrymf B, Yaici A, Girerd B and Humbert M (2007) Genes and pulmonary arterial hypertension. *Respiration. Int Rev Thor Dis* **74**:123-132.
- Tabima DM, Frizzell S and Gladwin MT (2012) Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med* **52**:1970-1986.
- Tagawa H, Shimokawa H, Tagawa T, Kuroiwa-Matsumoto M, Hirooka Y and Takeshita A (1999) Long-term treatment with eicosapentaenoic acid augments both nitric oxide-mediated and non-nitric oxide-mediated endothelium-dependent forearm vasodilatation in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* **33**:633-640.
- Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF and Tuder RM (2001) Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J* **15**:427-438.
- Thioub S, Mansourati J, Corporeau C, Heylen E, Delarue J and Guerrero F (2009) Effects of n-3 fatty acids and acute exercise on endothelium-dependent vasorelaxation in healthy rat aorta. *Br J Nutr* **101**:829-835.
- Thuong M and Leteurtre S (2003) Recommandations des experts de la Société de Réanimation de Langue Française: nutrition entérale en réanimation. *Réanimation* **12**:350-354.
- Toporsian M, Jerkic M, Zhou YQ, Kabir MG, Yu LX, McIntyre BA, Davis A, Wang YJ, Stewart DJ, Belik J, Husain M, Henkelman M and Letarte M (2010) Spontaneous adult-onset pulmonary arterial hypertension attributable to increased endothelial oxidative stress in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**:509-517.
- Tu L (2012) Innovation thérapeutique dans la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle pulmonaire, Université Paris Sud-Paris XI.
- Tual L, Morel OE, Favret F, Fouillit M, Guernier C, Buvry A, Germain L, Dhonneur G, Bernaudin JF and Richalet JP (2006) Carvedilol inhibits right ventricular hypertrophy induced by chronic hypobaric hypoxia. *Pflugers Archiv : Eur J Physiol* **452**:371-379.
- Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D and Voelkel NF (1999) Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **159**:1925-1932.
- Tuder RM, Groves B, Badesch DB and Voelkel NF (1994) Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* **144**:275-285.
- Tuder RM and Voelkel NF (2002) Angiogenesis and pulmonary hypertension: a unique process in a unique disease. *Antioxid Redox Signal* **4**:833-843.
- Tyler RC, Muramatsu M, Abman SH, Stelzner TJ, Rodman DM, Bloch KD and McMurtry IF (1999) Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. *Am J Physiol* **276**:297-303.
- Vanhoutte PM and Katusic ZS (1988) Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? *Trends Pharmacol Sci* **9**:229-230.
- Voelkel NF, Cool C, Lee SD, Wright L, Geraci MW and Tuder RM (1998) Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest* **114**:225S-230S.
- Voelkel NF and Tuder RM (1995) Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **8**:2129-2138.

- Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, Naeije R, Newman J, Oudiz RJ, Provencher S, Torbicki A, Voelkel NF and Hassoun PM (2014) Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *Turk Kardiyol Dern Ars* **42**:29-44.
- Vonk Noordegraaf A and Galie N (2011) The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* **20**:243-253.
- Waitzberg DL, Torrinhas RS and Jacintho TM (2006) New parenteral lipid emulsions for clinical use. *J Parenter Enteral Nutr* **30**:351-367.
- Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, Wang Y and Chopp M (2006) Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci* **26**:5996-6003.
- Wang Q, Liang X, Wang L, Lu X, Huang J, Cao J, Li H and Gu D (2012) Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atheroscler* **221**:536-543.
- Watts JA, Gellar MA, Stuart LK, Obratzsova M and Kline JA (2009) Proinflammatory events in right ventricular damage during pulmonary embolism: effects of treatment with ketorolac in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **54**:246-252.
- Watts JA, Marchick MR and Kline JA (2010) Right ventricular heart failure from pulmonary embolism: key distinctions from chronic pulmonary hypertension. *J Card Fail* **16**:250-259.
- Westphal C, Konkel A and Schunck WH (2015) Cytochrome p450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated Fatty acids and their role in cardiovascular disease. *Adv Exp Med Biol* **851**:151-187.
- Wilson D, Segall H, Pan L, Lame M, Estep J and Morin D (1992) Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical Rev Toxicol* **22**:307-325.
- Wilson DW, Segall H, Pan LC and Dunston SK (1989) Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* **38**:57-80.
- Wrigley BJ, Lip GY and Shantsila E (2011) The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *Eur J Heart Fail* **13**:1161-1171.
- Wynne BM, Chiao CW and Webb RC (2009) Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens* **3**:84-95.
- Yildiz P (2009) Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clin Chim Acta* **403**:9-16.
- Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV, Jr., Gaine SP, Orens JB and Rubin LJ (1998) Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circ* **98**:1400-1406.
- Yusof HM, Cawood AL, Ding R, Williams JA, Napper FL, Shearman CP, Grimble RF, Payne SP and Calder PC (2013) Limited impact of 2 g/day omega-3 fatty acid ethyl esters (Omacor(R)) on plasma lipids and inflammatory markers in patients awaiting carotid endarterectomy. *Marine drugs* **11**:3569-3581.
- Zaidi SH, You XM, Ciura S, Husain M and Rabinovitch M (2002) Overexpression of the serine elastase inhibitor elafin protects transgenic mice from hypoxic pulmonary hypertension. *Circ* **105**:516-521.

- Zanetti M, Grillo A, Losurdo P, Panizon E, Mearelli F, Cattin L, Barazzoni R and Carretta R (2015) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Structural and Functional Effects on the Vascular Wall. *BioMed Res Int* **2015**:791978.
- Zgheel F, Alhosin M, Rashid S, Burban M, Auger C and Schini-Kerth VB (2014) Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA:DHA 6:1. *PLoS One* **18**:105102

Potentiel de la formulation EPA:DHA 6:1 à prévenir la dysfonction endothéliale et le remodelage cardiopulmonaire dans l'hypertension artérielle pulmonaire chez le rat

Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une pathologie affectant les artères pulmonaires de petit calibre entraînant une augmentation des résistances artérielles pulmonaires aboutissant à une défaillance cardiaque droite. La vasoconstriction, le remodelage des artères pulmonaires distales, l'inflammation et le stress oxydant sont de facteurs clés de la pathogénèse de l'HTAP.

Nous avons testé les potentiels de la formulation EPA:DHA 6:1 à prévenir l'hypertension pulmonaire et les altérations cardiovasculaires et pulmonaires induites par l'injection de monocrotaline chez le rat.

Le traitement des rats monocrotaline avec l'EPA:DHA 6:1 (500 mg/kg/j, p.o) prévient significativement l'élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne, la pression systolique du ventricule droit, diminue le débit cardiaque, l'hypertrophie et la dilatation du ventricule droit. L'EPA:DHA 6:1 réduit également les résistances vasculaires pulmonaires, le remodelage des artérioles pulmonaires et les infiltrations lymphocytaires et macrophagiques. De plus, l'EPA:DHA 6:1 inhibe la production des espèces réactives de l'oxygène, diminue la surexpression des sous-unités p22^{phox} et p47^{phox} de la NADPH oxydase, des cyclooxygénases 1 et 2, des récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline-1, de la eNOS découplée et améliore la dysfonction endothéliale des artères pulmonaires.

L'EPA:DHA 6:1 exercent des effets anti-inflammatoires, antioxydants et vasoprotecteurs et prévient le développement de l'HTAP induite par l'injection de monocrotaline chez le rat.

Résumé en anglais

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by remodeling of the small pulmonary arteries leading to a progressive increase in pulmonary vascular resistance and right ventricular failure. Pulmonary endothelial dysfunction, inflammation and oxidative stress promote the development of pulmonary hypertension. Omega-3 polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA) have been shown to protect the cardiovascular system and reduce inflammation and oxidative stress.

The present study evaluate the potential of EPA:DHA 6:1 to prevent monocrotaline-induced PAH in rats.

EPA:DHA 6:1 treatment (500 mg/kg/d, p.o) prevented the MCT-induced mean pulmonary arterial pressure, right ventricular systolic pressure and decreased cardiac output. EPA:DHA 6:1 also attenuated right ventricular hypertrophy by reducing Fulton's index and pulmonary arterial remodeling, decreased lymphocytes T and macrophages infiltration. EPA:DHA 6:1 treatment significantly reduced MCT-induced vascular oxidative stress and improved endothelial function in pulmonary arteries. The protective effect of EPA:DHA 6:1 was associated with the prevention of the MCT-induced upregulation of NADPH oxidase subunits (p22^{phox} and p47^{phox}), COX-1 and COX-2, endothelin A and B receptors and uncoupled eNOS in pulmonary arterioles.

Our studies show that the EPA:DHA 6:1 formulation exerts anti-inflammatory, anti-oxidant and has a protective vascular effect in the pulmonary arteries, which may contribute to prevent and potentially cure pulmonary hypertension induced by MCT in rat.