



HAL
open science

**Nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques
dans l'hypertension pulmonaire : apport de la
tomodensitométrie et identification du facteur de
croissance des nerfs NGF comme nouvelle cible
thérapeutique**

Florence Coste

► **To cite this version:**

Florence Coste. Nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques dans l'hypertension pulmonaire : apport de la tomodensitométrie et identification du facteur de croissance des nerfs NGF comme nouvelle cible thérapeutique. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0120 . tel-02003561

HAL Id: tel-02003561

<https://theses.hal.science/tel-02003561v1>

Submitted on 1 Feb 2019

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE "Sciences de la Vie et de la Santé"
SPÉCIALITÉ Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par **Florence COSTE**

Née le 15 novembre 1987 à Montpellier

**Nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques dans
l'hypertension pulmonaire : apport de la tomодensitométrie
et identification du facteur de croissance des nerfs NGF
comme nouvelle cible thérapeutique**

Sous la direction du Docteur Véronique MICHEL

Soutenue le 30 septembre 2016

Membres du jury :

Mme AMEEDÉ, Joëlle, Directeur de recherche, Université de Bordeaux
Mme COHEN-KAMINSKY, Sylvia, Directeur de recherche, université Paris Sud
Mme FROSSARD, Nelly, Directeur de recherche, Université de Strasbourg
M. GUIGNABERT, Christophe, Chargé de recherche, Université Paris Sud
Mme MICHEL, Véronique, Maître de conférences, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Invité
Directeur de thèse

Nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques dans l'hypertension pulmonaire : apport de la tomodensitométrie et identification du facteur de croissance des nerfs NGF comme nouvelle cible thérapeutique

Résumé : L'hypertension pulmonaire (HTP) est définie par une valeur de pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos. Il existe des formes sévères d'HTP (HTPs) avec des valeurs de PAPm encore plus élevées associées à des symptômes plus marqués et à l'apparition de lésions anatomopathologiques spécifiques. Le diagnostic et le développement de nouvelles thérapies sont des enjeux majeurs pour une meilleure prise en charge de ces patients

À l'aide de la tomodensitométrie, nos travaux observationnels chez l'homme atteint de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ont montré une corrélation de l'HTP avec le remodelage bronchique et non pas avec l'emphysème. L'HTPs peut être une complication rare mais grave de la BPCO. L'évaluation *in vivo* des modifications du lit vasculaire pulmonaire a permis de confirmer l'existence d'un phénotype particulier chez les patients atteints de BPCO compliquée d'HTPs. De plus, la définition d'un score combiné comprenant des paramètres non invasifs tomodensitométriques devrait permettre de sélectionner plus finement les patients devant subir un cathétérisme cardiaque droit.

En parallèle, dans nos travaux expérimentaux, nous avons complété la caractérisation d'un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire chez le rat développant un phénotype sévère (HTAPs) et présentant des lésions artérielles pulmonaires caractéristiques de la maladie humaine. Ce modèle, ainsi que des modèles animaux plus classiques d'HTP, nous ont permis d'identifier un rôle du facteur de croissance des nerfs NGF dans cette pathologie, dont le ciblage pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Mots clés : hypertension pulmonaire (HTP), HTP sévère, modèle animal, facteur de croissance des nerfs (NGF), cible thérapeutique, diagnostic, tomodensitométrie

New diagnostic and therapeutic approaches in pulmonary hypertension: benefits from computed tomography and identification of the nerve growth factor NGF as a new therapeutic target

Abstract : Pulmonary hypertension (PH) is defined by a mean pulmonary arterial pressure (mPAP) at or above 25 mmHg at rest. Severe forms of PH (sPH) are characterized by a stronger elevation of mPAP, more marked symptoms and specific pulmonary vascular lesions. Real challenges come from a better diagnosis for these patients and identification of new therapeutic targets to improve their therapeutic care.

Our results show by computed tomography that PH associated to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is correlated to airway remodeling and not to emphysema. Severe PH is a rare and serious complication of COPD. We confirmed existence of a phenotype in COPD patients with sPH, by evaluating *in vivo* modifications of the pulmonary vascular bed in these patients. Moreover, we defined a combined score, which may be a non-invasive tool to select patients for right heart catheterization

In parallel, we completed the characterization of a rat model of severe pulmonary arterial hypertension (sPAH) that developed a severe phenotype with pulmonary arterial specific and human-like lesions. In this model, as well as in more classical PH models, our results demonstrated an increased expression of the nerve growth factor NGF and its role in PH and sPAH pathophysiology. These results therefore suggest that NGF may be an interesting target to develop new therapeutic perspectives in this disease.

Keywords : Pulmonary hypertension (PH), severe PH, animal model, nerve growth factor (NGF), therapeutic target, diagnostic, computed tomography

REMERCIEMENTS :

Je remercie l'ensemble du jury d'avoir accepté de juger ce travail :

Je tiens à remercier, en premier lieu, Madame le Docteur Véronique MICHEL pour m'avoir confié ce sujet très intéressant, d'avoir accepté de diriger ma thèse, de m'avoir encouragée à participer à de passionnants congrès, ainsi que pour ses conseils et son aide précieuse.

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mes sentiments les plus respectueux.

J'adresse également mes remerciements à Madame le Docteur Joëlle AMEDEE de me faire l'honneur de présider ce jury, pour avoir été très disponible en tant que tutrice de thèse, ainsi que pour le temps qu'elle a accordé à la lecture du manuscrit.

Soyez assurée de ma très grande reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie beaucoup Madame le Docteur Sylvia COHEN-KAMINSKY d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Cela a toujours été un plaisir de vous retrouver lors des congrès, et de pouvoir y échanger des idées ; merci beaucoup pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux. Soyez assurée de ma gratitude et de mon respect sincère.

Je remercie aussi Madame le Docteur Nelly FROSSARD d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que rapporteur.

J'ai été ravie de vous avoir rencontrée lors du Lungstorming. Soyez assurée de ma très grande reconnaissance pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Docteur Christophe GUIGNABERT pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et pour tous ses excellents conseils scientifiques.

C'était également toujours très agréable de vous revoir lors des congrès de pneumologie. Je vous remercie encore d'avoir pris le temps de venir pour ma mi-thèse. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respect.

Au laboratoire :

J'adresse un grand MERCI à toute l'unité INSERM U1045 pour leur présence, leur aide et leur soutien : cela a été un très grand plaisir de travailler à vos côtés.

Je remercie Monsieur le Professeur Roger MARTHAN de m'avoir accueillie au sein de l'unité et dans son service des E.F.R., ainsi que pour sa très grande disponibilité, sa relecture d'articles très pertinente et ses bons conseils.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Pierre SAVINEAU et le Docteur Christelle GUIBERT de m'avoir accueillie dans leur équipe, et de m'avoir permis de participer à des congrès très enrichissants scientifiquement. Je remercie également Monsieur le Professeur Bernard MULLER pour ses bons conseils en particulier concernant mon orientation scientifique.

Merci à tous les membres du Loft (présents et passés) pour votre présence, votre soutien et votre bonne humeur quotidienne : Amandine, Hannah, Laure-Anne, Tiare, Le Bureau 15 : Juliette, Thibaud, Guillaume, Nafiisha, Benoît et Angélique ;) . Je remercie aussi nos super secrétaires : Lebna et Armelle. Je remercie également Jennifer pour son dynamisme et toute son aide scientifique et informatique. Merci à tous les techniciens et animaliers du laboratoire pour votre aide et votre bonne humeur : Marilyne+, Elise, Paul, Olga, Fabienne, Magalie et Elodie. Je remercie tous les membres du laboratoire et en particulier ceux qui ont pu m'aider avec leurs bons conseils et leur aide : Claude, Christian, Isabelle B., Arnaud, Isabelle D., Mariette, Jean-François, Thomas D., Thomas T., Valérie, Mathilde, Eric, Fabrice, Frédéric et Delphine. Sans oublier tous les étudiants du Loft annexe : Clémence, Sophie, Fabien et les anciens Thomas, Valentin, Nichi, Mélanie, Eva, Marie, Léa, Paul, Audrey et Matthieu. En espérant n'avoir oublié personne.

Un grand merci à l'ensemble des membres du personnel des services du CHU dans lesquels j'ai pu travailler tout au long de mon internat, et plus particulièrement, au service d'imagerie médicale avec qui j'ai pu publier de beaux résultats. Je remercie Monsieur le Professeur François LAURENT pour m'avoir si bien intégrée au sein de son service d'imagerie médicale, où j'ai pu être guidée dans un travail loin de mes compétences initiales. J'adresse également mes remerciements au Docteur Gaël DOURNES qui m'a permis de

mieux appréhender certains aspects de la recherche : je n'ai jamais autant aimé la bibliographie que dans le service ! Merci pour toutes nos conversations et vos éclaircissements. Je n'oublie pas la très grande patiente des titulaires (Olivier, Michel, Hubert, Valérie) et de mes co-internes. Merci à tous les membres du service pour leur bonne humeur contagieuse. J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Patrick BERGER pour m'avoir aussi bien guidée dans l'écriture du manuscrit.

A mes amis :

Je remercie tous mes amis pour leur soutien et leur compréhension ; merci d'être toujours là pour rigoler et pour me changer les idées !

A ma famille :

J'exprime toute ma reconnaissance à l'ensemble de ma famille pour leur soutien, leurs soins, leur confiance et leur amour. Les mots paraissent bien faibles pour exprimer toute ma gratitude.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	9
PRÉFACE	11
INTRODUCTION.....	13
1. Circulation pulmonaire.....	13
1.1. Rôle et organisation.....	13
1.2. Structure de la paroi artérielle pulmonaire	16
1.1.1. Intima.....	16
1.1.2. Media.....	17
1.1.3. Adventice.....	17
2. Généralités sur l’Hypertension pulmonaire (HTP).....	19
2.1. Définition et généralités	19
2.2. Signes cliniques et diagnostic.....	20
2.3. Classification	26
2.3.1. Groupe 1 : L’hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)	28
2.3.2. Groupe 1’ : Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO) et hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP)	31
2.3.3. Groupe 1’’ : Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né (PPHN)	31
2.3.4. Groupe 2 : Hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche.....	32
2.3.5. Groupe 3 : HTP associée à une maladie pulmonaire et/ou à l’hypoxie.....	33
2.3.6. Groupe 4 : HTP post-embolique chronique (CTEPH)	34
2.3.7. Groupe 5 : HTP dont le mécanisme est multifactoriel et incertain.....	35
2.4. Mécanismes physiopathologiques	35
2.4.1. Inflammation	35
2.4.2. Altérations de la réactivité pulmonaire.....	37
2.4.3. Remodelage vasculaire pulmonaire.....	38
2.4.4. Facteur de gravité : le remodelage cardiaque	44
3. Traitements, problématiques actuelles et nouvelles pistes d’étude de l’HTP	46
3.1. Traitements actuels.....	46
3.1.1. Objectifs et stratégie thérapeutique	46
3.1.2. Traitements médicamenteux non spécifiques.....	49
3.1.2.1. Traitement anticoagulant.....	49
3.1.2.2. Traitement diurétique	49

3.1.2.3.	Digitaliques	49
3.1.3.	Traitements médicamenteux spécifiques	50
3.1.3.1.	Inhibiteurs d'influx calcique	50
3.1.3.2.	La voie de la prostacycline.....	51
3.1.3.3.	La voie du NO.....	52
3.1.3.4.	Antagonistes des récepteurs de l'endothéline.....	53
3.1.3.5.	Les combinaisons thérapeutiques.....	54
3.1.4.	Traitements non médicamenteux.....	55
3.1.4.1.	Oxygénothérapie au long cours.....	55
3.1.4.2.	Endartériectomie.....	55
3.1.4.3.	L'atrioseptostomie.....	55
3.1.4.4.	Transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire.....	56
3.1.5.	Prévention des complications et éducation thérapeutique	56
3.2.	Difficultés de diagnostiquer de manière spécifique chaque type d'HTP	57
3.2.1.	Difficultés actuelles de caractérisation des différents types d'HTP	57
3.2.2.	Apport de l'imagerie thoracique.....	60
3.2.2.1.	La radiographie.....	60
3.2.2.2.	Le scanner thoracique (tomodensitométrie)	60
3.2.2.3.	L'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	64
3.3.	Modèles expérimentaux d'HTP chez le rat	66
3.3.1.	Modèles classiques	66
3.3.1.1.	Monocrotaline (MCT)	66
3.3.1.2.	Hypoxie chronique (Hx).....	67
3.3.2.	Modèles sévères d'HTAP.....	68
3.3.2.1.	Sugen	68
3.3.2.2.	Sugen et pneumonectomie	70
3.3.2.3.	Monocrotaline et pneumonectomie	70
3.3.2.4.	Modèle combinant une injection de monocrotaline et l'hypoxie chronique (MCT+Hx) 71	
3.4.	Nouvelles pistes de traitements	74
3.4.1.	Traitements en voie de développement	74
3.4.1.1.	Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine.....	74
3.4.1.2.	Inhibiteurs de Rho-kinase.....	74
3.4.1.3.	Modulateurs de l'immunité et de l'inflammation.....	75
3.4.1.4.	Ciblage du peptide intestinal vasoactif (VIP).....	75

3.4.1.5.	Les microARN.....	76
3.4.1.6.	Rôle potentiel de progéniteurs cellulaires dans l’HTP	76
3.4.1.7.	Les inhibiteurs de tyrosine kinase et les facteurs de croissance	77
3.4.2.	Une hypothèse thérapeutique : le NGF ?.....	79
3.4.2.1.	Généralités sur le NGF.....	79
3.4.2.2.	Les récepteurs du NGF et leurs voies de signalisation	81
3.4.2.2.1.	Le récepteur TrkA.....	82
3.4.2.2.2.	Le récepteur p75 ^{NTR} (ou récepteur p75 des neurotrophines).....	86
3.4.2.3.	Rôles potentiels du NGF dans l’HTP	87
3.4.2.3.1.	Expression du NGF et de ses récepteurs dans l’HTP	87
3.4.2.3.2.	Rôles physiopathologiques potentiels du NGF dans l’HTP.....	88
OBJECTIFS	92
RÉSULTATS	95
Publication n°1	95
Publication n°2	97
Publication n°3	99
Publication n°4	100
Publication n°5	102
DISCUSSION et PERSPECTIVES	105
Apport de la tomodensitométrie dans la compréhension de la physiopathologie de l’HTP et aide au diagnostic		105
Développement d’un modèle animal pertinent d’HTAP sévère.....		107
Identification d’une nouvelle cible thérapeutique : le NGF		109
Perspectives expérimentales.....		113
CONCLUSION	118
REFERENCES :	121
PUBLICATIONS	145

LISTE DES ABREVIATIONS :

Ac : Anticorps	NO : monoxyde d'azote
ARNm : ARN messenger	NYHA : « New-York Heart Association »
BNP : Peptide Natriurétique B	O₂ : Dioxyde d'oxygène
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive	PAPs,m,d : Pression Artérielle Pulmonaire systolique, moyenne, diastolique
CE : Cellule Endothéliale	PCWP : Pression capillaire bloquée
CI : Index Cardiaque	PDGF : « Platelet-Derived Growth Factor »
CML : Cellule Musculaire Lisse	PGF : Prostaglandine
CO : Débit cardiaque	PI3K : Phosphatidyl inositol-3 kinase
CO₂ : Dioxyde de carbone	PLC/PKC : Phospholipase C/Protéine kinase C
CTEPH : hypertension pulmonaire thromboembolique	PO₂ : Pression partielle en oxygène
DLCO : Diffusion Libre du Monoxyde de Carbone	p75^{NTR} : Récepteur p75 des neurotrophines
ECG : Electrocardiogramme	RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire
EFR : Explorations Fonctionnelles Respiratoires	RVP : Résistances Vasculaires Pulmonaires
HCP : Hémangiomasose Capillaire Pulmonaire	VD : Ventricule Droit
HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire	TNFα : « Tumor Necrosis Factor α »
HTP / HTPs : Hypertension Pulmonaire / Hypertension Pulmonaire sévère	Trk : « Tropomyosin receptor kinase»
Hx : Hypoxie chronique	UH : unité Hounfield
IL : Interleukine	VEGF : «Vascular Endothelial Growth Factor»
IRM : imagerie par résonance magnétique	WT : « Wall thickness»
LAA% : « low atenuation area percent »	6MWT : Test de marche de 6 minutes
MVO : Maladie veino-occlusive	
MCT : Monocrotaline	
MMP : Métalloprotéinases de matrice	
NGF : « Nerve growth factor»	%CSA : « cross sectional area percent »

PRÉFACE

PRÉFACE

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie très invalidante, dont le diagnostic est posé pour une valeur de pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos. De plus, il existe des formes qualifiées d'HTP sévère (HTPs) qui correspondent à des formes cliniques plus graves, à l'apparition de lésions anatomopathologiques spécifiques, et à des valeurs de PAPm encore plus élevées. L'HTP est une maladie grave car elle peut entraîner une insuffisance cardiaque, et à terme le décès des patients. En outre, à cause du manque de spécificité des symptômes associés, le diagnostic est très souvent tardif, ce qui assombrit le pronostic.

Plusieurs problématiques actuelles rendent difficiles un diagnostic plus précoce et une meilleure prise en charge thérapeutique des patients. En particulier, la technique permettant actuellement la mesure de la PAPm est le cathétérisme cardiaque droit, une technique fiable mais invasive. Le développement d'une technique diagnostique fiable, mais non invasive, pourrait permettre de faciliter un diagnostic plus précoce, favorisant ainsi une prise en charge également plus précoce et donc plus efficace. D'autre part, s'il existe des traitements symptomatiques de l'HTP, il n'existe pas encore de traitement curatif. La recherche doit donc continuer dans ce domaine afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Malheureusement, l'HTP est une maladie difficile à étudier, car il est compliqué d'obtenir des échantillons d'origine humaine, du fait du faible nombre d'individus atteints, et de la contre-indication à effectuer des biopsies pulmonaires chez ces patients. Il est donc capital de pouvoir utiliser des modèles animaux pertinents capables de mimer les principaux aspects de la pathologie humaine. Ces modèles pourraient ainsi permettre une meilleure compréhension de la maladie et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Au cours de cette thèse, j'ai essayé d'apporter quelques réponses à ces problématiques diagnostiques et thérapeutiques actuelles dans l'HTP.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. Circulation pulmonaire

1.1. Rôle et organisation

Le sang circule dans deux grands circuits chez l'Homme : les circulations systémique et pulmonaire. Le cœur est l'organe qui permet par ses contractions de faire circuler le sang. La circulation systémique, aussi appelée grande circulation, permet d'alimenter les organes en nutriments et en dioxygène. Dans la circulation pulmonaire, aussi appelée petite circulation, le sang est éjecté par le ventricule droit lors de la systole dans le tronc de l'artère pulmonaire. Ce tronc se divise ensuite au sein du poumon en 19 segments chez l'Homme. Le nombre d'ordre des artères pulmonaires chez l'Homme est de 17 (1), et de 11 chez le rat. Chez l'Homme, le poumon droit est composé de 3 lobes, alors que le poumon gauche n'en a que 2 ; Figure 1. Chez le rat, le poumon gauche est un lobe unique, contre 4 lobes dans le poumon droit.

Les artères pulmonaires et les voies aériennes humaines suivent un chemin commun chez l'Homme comme chez le rat. (2, 3) ; Figure 2.

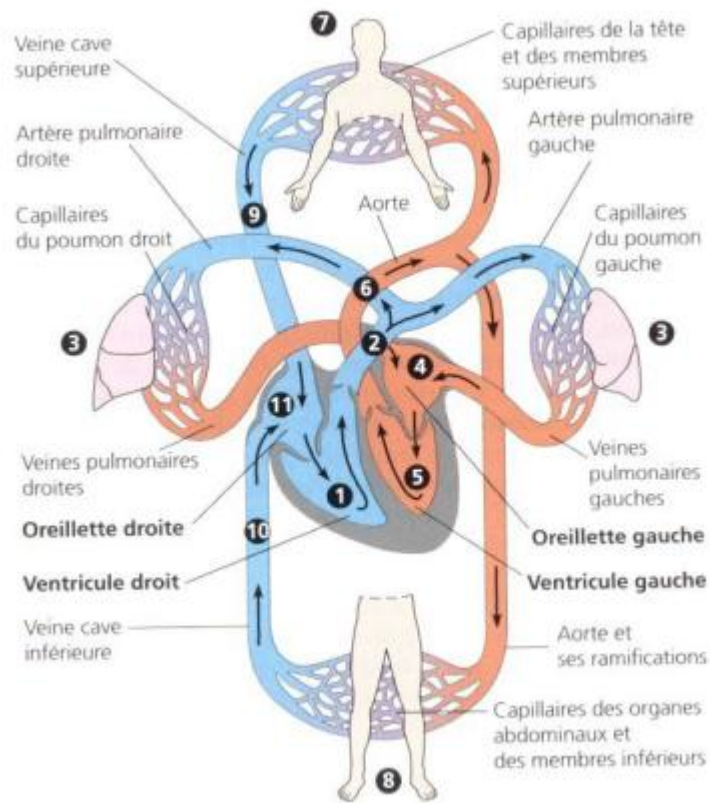
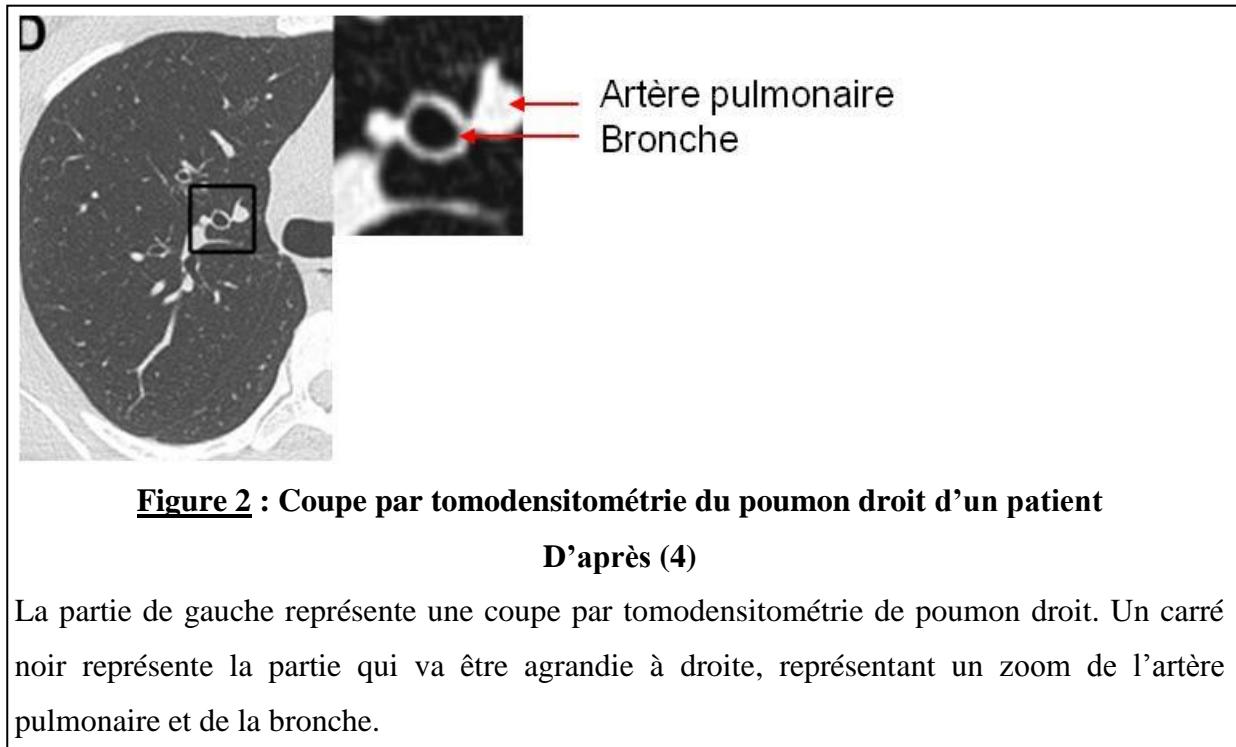


Figure 1 : Système cardiovasculaire de l'Homme

D'après BIOLOGIE, CAMPBELL/REECE, 2^{ème} édition (adaptation et révision scientifique de Richard Mathieu), Editions de BOECK

1 : ventricule droit. 2 : tronc de l'artère pulmonaire. 3 : lit capillaire des poumons. 4 : oreillette gauche. 5 : ventricule gauche. 6 : aorte. 7 : capillaire de la tête et des membres supérieurs. 8 : capillaires des organes abdominaux et des membres inférieurs. Les circulations sont colorées en rouge et en bleu et correspondent respectivement au sang riche et au sang pauvre en dioxygène.

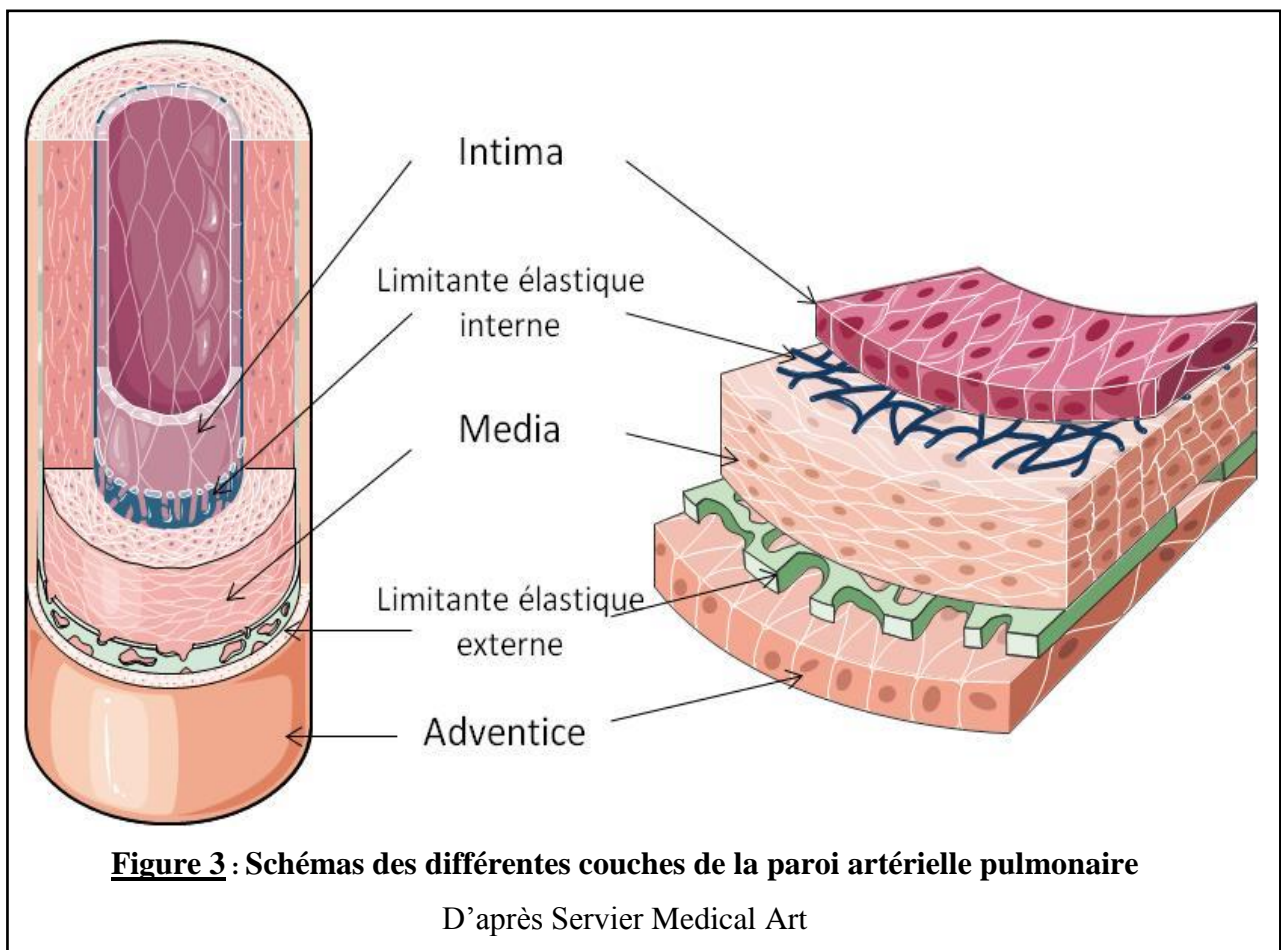


La circulation pulmonaire est un système à haut débit et à faible pression. Les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne sont respectivement de 22, 10 et 15 mmHg au repos (5). A titre de comparaison, la pression systémique est plus élevée, avec une pression artérielle systolique variant entre 80 et 120 mmHg.

La circulation pulmonaire a pour rôle principal de ré-oxygéner le sang et d'éliminer le dioxyde de carbone (CO_2) au niveau des poumons. Le sang pauvre en dioxygène arrive dans le poumon dans les artères pulmonaires, passe par les artérioles pour arriver jusqu'aux capillaires. Au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, des échanges gazeux ont lieu entre l'air et le sang des capillaires : rejet de CO_2 et absorption de dioxygène (O_2). Ce sang ré-oxygéné revient vers le cœur gauche par les veines pulmonaires (pression partielle en dioxygène : $\text{PO}_2 = 100 \text{ mmHg}$)

1.2. Structure de la paroi artérielle pulmonaire

Les artères pulmonaires sont composées de trois couches successives de cellules. La couche de cellules la plus proche de la lumière de l'artère est l'intima, puis vient la media et enfin l'adventice. Chacune de ces couches est séparée des autres par une limitante élastique ; Figure 3. Cette limitante élastique est principalement composée de fibres de collagène et d'élastine.



1.1.1. Intima

L'intima est une monocouche de cellules endothéliales (CE). Cette couche est en contact direct avec la lumière de l'artère pulmonaire. Par cette proximité avec le sang, les CE sont donc accessibles aux hormones, aux neuromédiateurs circulants, mais aussi sensibles aux variations de pression du flux sanguin (stretch).

Les CE sont capables de sécréter des molécules qui vont pouvoir diffuser jusqu'aux cellules musculaires lisses (CML) voisines et entraîner une vasoconstriction (thromboxane A₂, sérotonine, endothéline-1, prostaglandine F_{2α}, angiotensine II), une vasodilatation (monoxyde d'azote, prostacycline) ou encore une inflammation (espèces dérivées de l'oxygène) (6).

L'intima est séparée de la media par la limitante élastique interne.

1.1.2. Media

La media est composée de plusieurs couches de CML. Ces cellules disposées de manière concentrique autour de l'artère pulmonaire ont la capacité de se contracter afin de pouvoir réguler le flux sanguin et la pression sanguine. Elles sont sensibles à l'action de molécules vasocontractantes et vasorelaxantes.

Un mécanisme spécifique à la circulation pulmonaire peut être mis en jeu lorsqu'une zone du poumon est moins bien ventilée : la vasoconstriction hypoxique. Elle permet aux CML des artères irrigant les zones moins ventilées de se contracter afin que le flux sanguin soit redirigé vers les zones pulmonaires normalement ventilées. La vasoconstriction hypoxique permet d'assurer une bonne hématose du sang et un bon rapport ventilation sur perfusion.

Les petites artères, aussi appelées artères distales ou artérioles, dont le diamètre est inférieur à 100 µm sont dépourvues de CML (7, 8).

La media se situe entre les limitantes élastiques interne et externe.

1.1.3. Adventice

L'adventice est la tunique externe de la paroi artérielle, au-delà de la limitante élastique externe. L'adventice au niveau des artères distales est apposée à l'épithélium des voies aériennes (9). Elle est innervée par le système nerveux autonome et plus précisément par le système nerveux sympathique. Les gros vaisseaux sanguins sont irrigués par le réseau de *vasa vasorum* (latin signifiant les vaisseaux des vaisseaux). Ils permettent d'alimenter les gros vaisseaux en nutriments et en dioxygène et d'éliminer les déchets.

L'adventice est composée d'une matrice extracellulaire, de fibroblastes et d'autres cellules interstitielles. Les fibroblastes participent à la genèse de fibres de collagène, de fibronectine, de protéoglycanes et d'élastine. L'adventice est le siège des éventuelles infiltrations inflammatoires par des cellules comme les mastocytes, les monocytes, les macrophages et/ou les cellules dendritiques par exemple. Ces cellules peuvent ensuite migrer selon un phénomène « outside-in », c'est-à-dire que les cellules infiltrées au niveau de l'adventice vont pouvoir migrer vers le centre des vaisseaux (10).

2. Généralités sur l'Hypertension pulmonaire (HTP)

L'hypertension pulmonaire (HTP) est l'une des principales pathologies de la circulation pulmonaire.

2.1. Définition et généralités

L'HTP est définie par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure ou égale à 25 mmHg au repos (11). Chez le sujet sain, la PAPm est comprise entre 10 et 15 mmHg au repos (5). Toutefois, cette pression peut évoluer au cours du vieillissement, en augmentant jusqu'à 1 mmHg par tranche de 10 ans.

L'augmentation de la PAPm est due à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP). Cette augmentation des résistances est causée par un rétrécissement de la lumière des artères pulmonaires. Ce rétrécissement de la lumière artérielle est lié à une invasion de la lumière artérielle et à une prolifération excessive des CML et des CE, associée à une surproduction de matrice extracellulaire et à une infiltration importante de cellules inflammatoires ; cette lumière artérielle lésée permet également l'adhésion de plaquettes. En parallèle de cette inflammation et de ce remodelage, un phénomène de vasoconstriction augmentée des artères pulmonaires a été démontré.

Le lien entre la PAPm et les RVP se traduit par la formule : pression artérielle = volume d'éjection systolique x fréquence cardiaque x RVP. Les RVP sont déterminées par l'équation : $RVP = (PAPm - \text{Pression capillaire pulmonaire}) / \text{débit cardiaque}$. Cette augmentation des résistances entraîne une augmentation de la post-charge du ventricule droit (VD). Le cœur doit donc fournir plus d'effort pour vaincre ces résistances. Le VD se déforme pour pouvoir augmenter son volume d'éjection systolique et s'hypertrophie petit à petit. Cette hypertrophie va conduire à une insuffisance cardiaque droite, entraînant à terme le décès du patient.

L'HTP est une maladie rare et de mauvais pronostic. Elle peut survenir à n'importe quel âge, mais le diagnostic est en moyenne posé pour des sujets de 50,1 ans (12).

Les causes les plus fréquentes d'HTP sont les maladies du cœur gauche ou les maladies respiratoires chroniques (13, 14).

2.2. Signes cliniques et diagnostic

Le diagnostic de l'HTP est tardif à cause du manque de spécificité des symptômes (essoufflement, dyspnée). D'après Badesch *et al.*, il s'écoule environ 2,8 ans entre l'apparition des symptômes de la maladie et son diagnostic (12). Ce diagnostic est réalisé en plusieurs étapes, décrites ci-dessous. Il est généralement posé dans des centres de référence de l'HTP. Ces centres de référence réunissent régulièrement des professionnels de différentes spécialités (pneumologie, cardiologie, radiologie...) lors de réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) où le cas de chaque patient sera examiné afin de poser le diagnostic d'HTP, de réaliser le diagnostic différentiel et d'évaluer la sévérité. Un arbre des différentes étapes du diagnostic d'HTP est présenté en [Figure 4](#).

Cette démarche diagnostique se décompose en plusieurs étapes :

- Détection et confirmation de l'HTP

L'interrogatoire du patient est capital pour établir un diagnostic. Il faut interroger le patient sur les facteurs de risque de développer une HTP : prise d'anorexigène, antécédents familiaux, maladie pulmonaire autre, infection par le V.I.H., cardiopathie congénitale...

Lors de l'examen physique, le praticien recherche les signes d'éventuelles pathologies pouvant être associées au développement d'une HTP ou d'une pathologie pouvant compliquer l'HTP (insuffisance cardiaque gauche, pathologie valvulaire, maladie respiratoire chronique...). Le test de marche à 6 minutes (6MWT) est le test qui évalue le mieux la capacité physique des patients. Le 6MWT correspond à la distance maximale que le patient peut effectuer en marchant pendant la durée de 6 minutes, il est exprimé en mètres. Ce 6MWT est corrélé avec la mortalité (15).

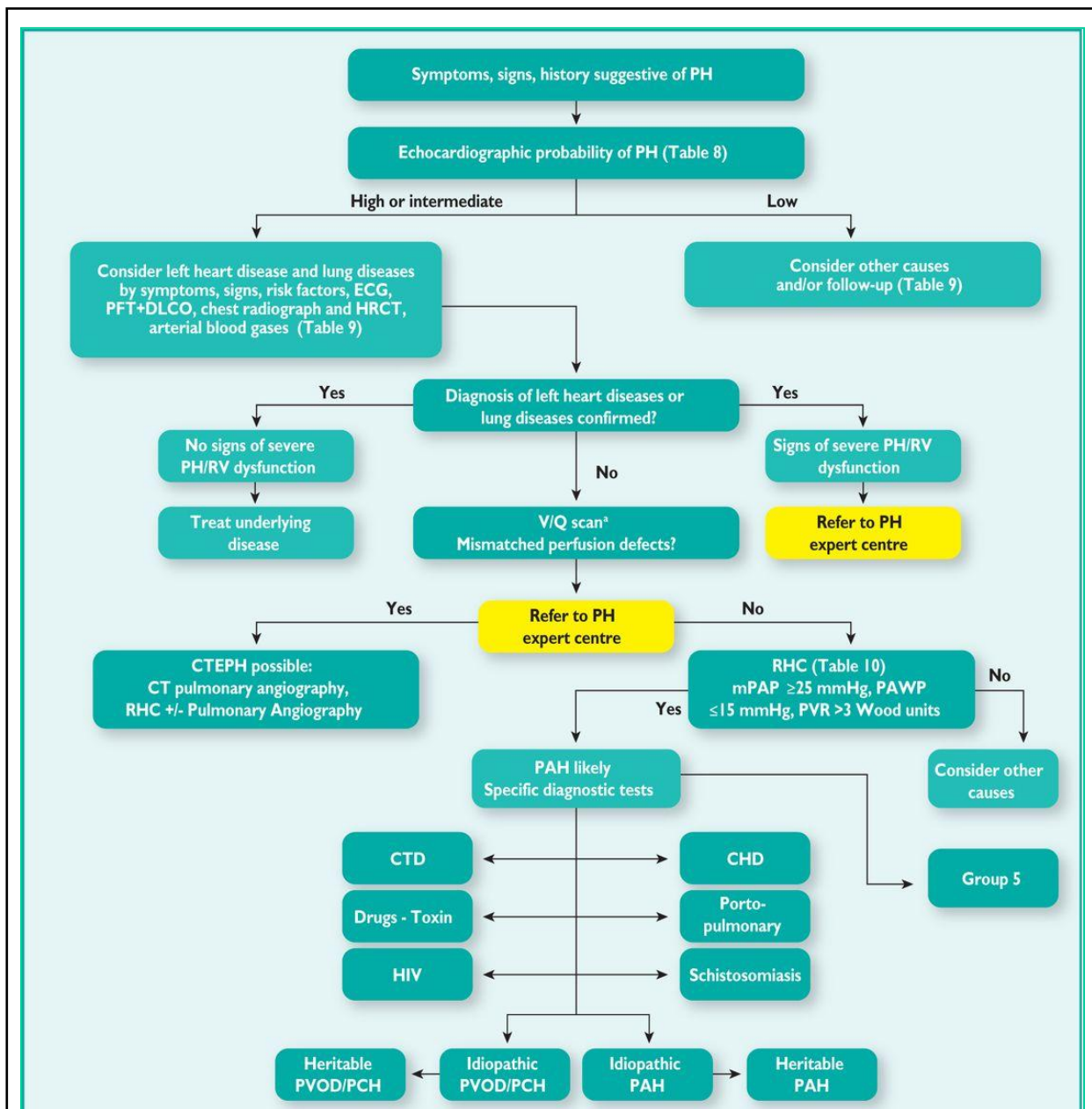


Figure 4 : Diagnostic de l'hypertension pulmonaire

D'après (16, 17)

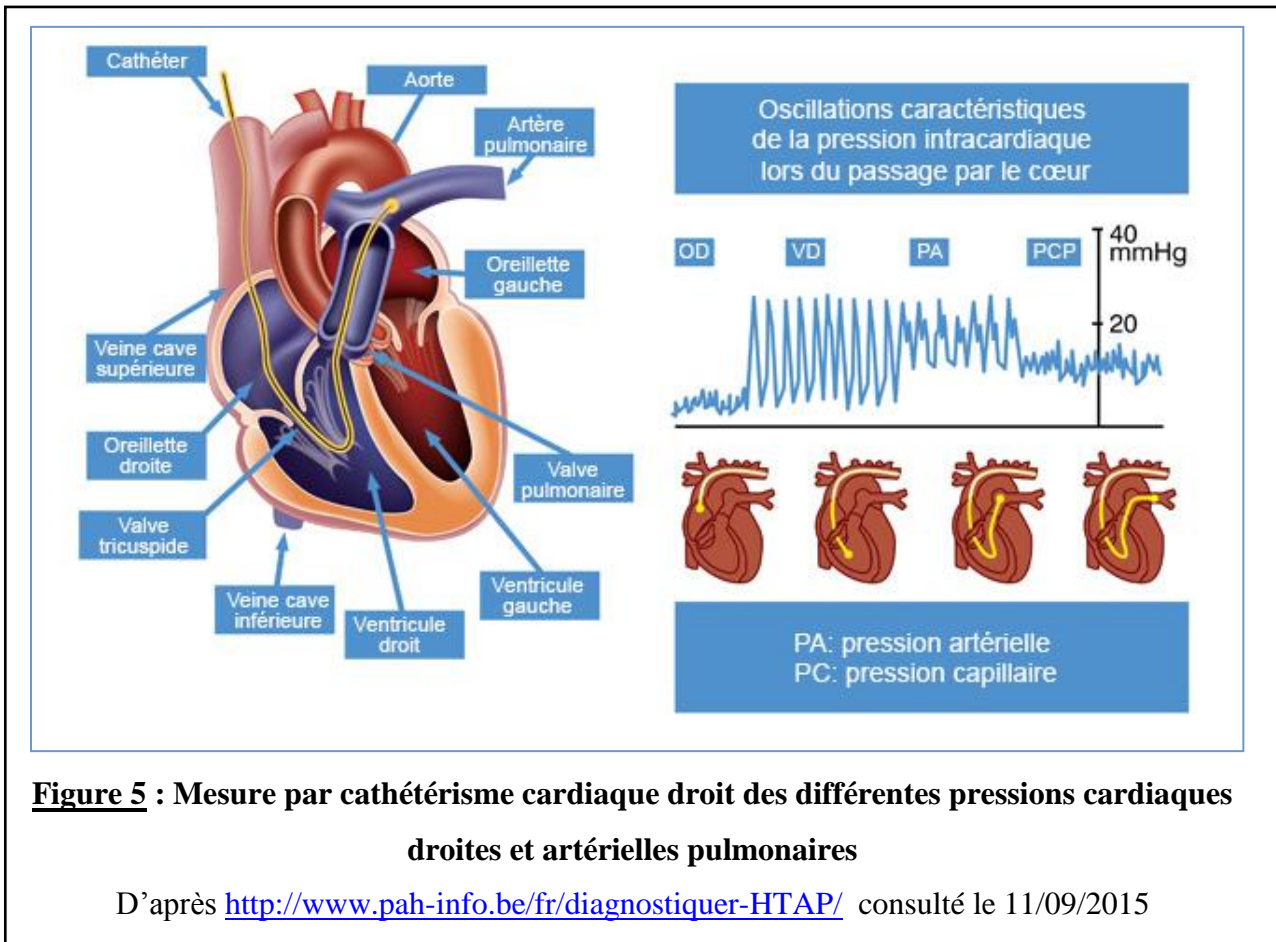
BGA = blood gas analysis = gaz du sang; CHD = congenital heart disease = maladie cardiaque congénitale; CTD = connective tissue disease = connectivite ; CTEPH = chronic thromboembolic pulmonary hypertension = hypertension pulmonaire thromboembolique; DLCO = TLCO = diffusion capacity of the lung for carbon monoxide = Diffusion Libre du Monoxyde de Carbone ; ECG = electrocardiogram = électrocardiogramme; HRCT = high-resolution computed tomography = tomographie à haute résolution; PA = pulmonary angiography = angiographie pulmonaire; PAH = pulmonary arterial hypertension = HTAP; mPAP = mean pulmonary artery pressure = PAPm; PAWP = PCWP = pulmonary arterial wedge pressure; PCH = pulmonary capillary hemangiomas = hémangiomes capillaires pulmonaires; PEA = pulmonary endarterectomy = endartérectomie pulmonaire; PFT = EFR = pulmonary function testing; PH = pulmonary hypertension = HTP; PVOD = pulmonary veno-occlusive disease = maladie veino-occlusive pulmonaire; PVR = pulmonary vascular resistance = RVP; RHC = right heart catheter = cathétérisme Coeur droit; RV = right ventricle = VD; V/Q = ventilation/perfusion; x-ray = chest radiograph = radiographie.

Lors d'une suspicion d'HTP, le 1^{er} examen qui suit l'interrogatoire est l'échographie transthoracique qui permet d'éliminer les cas peu probables, et d'éviter aux patients non atteints d'HTP un cathétérisme cardiaque droit, qui est l'examen de référence pour poser le diagnostic d'HTP avec certitude mais qui est une procédure invasive.

L'échographie transthoracique couplée au doppler permet d'estimer la PAPs par la mesure de la vitesse maximale de la fuite tricuspide et l'estimation de la pression auriculaire droite. Une suspicion d'HTP est validée pour une valeur de PAPs supérieure à 35 mmHg. D'autres anomalies cardiaques peuvent aussi être recherchées telles que, pour le cœur droit : une dilatation des cavités droites associée à un mouvement paradoxal du septum interventriculaire ; un possible épanchement péricardique de mauvais pronostic peut également être observé. L'échographie permet aussi de rechercher d'éventuelles malformations congénitales, ou un shunt cardiaque droit-gauche (le test des bulles, par injection de microbulles d'air, permet d'observer plus facilement l'ouverture du *foramen ovale*), ou encore une possible anomalie au niveau du septum auriculaire (18).

Toutefois, l'examen de référence permettant de confirmer le diagnostic d'HTP est le cathétérisme cardiaque droit, mettant en évidence une PAPm supérieure ou égale à 25 mmHg au repos.

Cet examen invasif consiste à introduire un cathéter relié à un manomètre dans une veine périphérique, le plus souvent la veine jugulaire interne ou fémorale. Une ponction veineuse est faite, puis, un introducteur est mis en place, et une sonde est poussée dans la veine cave supérieure ou inférieure, en fonction de la veine d'entrée. La sonde passe la valve tricuspide, arrive dans le VD et, après avoir effectué un mouvement dans le sens des aiguilles d'une montre, à l'aide du gonflement du ballonnet à l'embout distal, la sonde est alors introduite dans le tronc de l'artère pulmonaire. Arrivée dans l'artère pulmonaire, la sonde est enfoncée le plus loin possible sans forcer, et on obtient ainsi la pression capillaire bloquée (PCWP). Quand on dégonfle le ballonnet, on obtient les PAP. En retirant la sonde jusque dans le VD, on obtient la pression ventriculaire droite puis, en la retirant dans l'oreillette droite, on peut alors mesurer la pression dans l'oreillette droite ; Figure 5.



L'électrocardiogramme (ECG) peut aussi être un outil pour observer les anomalies cardiaques, en particulier une hypertrophie de l'oreillette droite et du VD, mais avec une faible sensibilité (19, 20), la sensibilité étant la capacité d'un test à observer la pathologie quand elle est effectivement présente (test positif).

Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) sont réalisées de manière concomitante avec l'analyse des gaz du sang, où les prélèvements sont effectués en air ambiant afin de déterminer la PaO_2 et la $PaCO_2$ (exprimés en mmHg). Ces examens sont très importants pour identifier et caractériser le trouble ventilatoire (obstructif, restrictif ou mixte), diagnostiquer une BPCO (coefficient ou rapport de Tiffeneau qui est inférieur à 70% dans cette pathologie). Un trouble de la fonction respiratoire peut aussi avoir pour origine une hypoventilation alvéolaire, un trouble de la perfusion ou encore un trouble de la diffusion gazeuse. Dans l'HTP, une diminution de la diffusion libre du monoxyde de carbone ou DLCO est également observée.

Des examens complémentaires de biologie sont prescrits afin de doser certains facteurs, comme par exemple le facteur ou peptide natriurétique B (BNP), dont l'expression est augmentée dans l'HTP sévère associée à la BPCO (21). La biologie peut aussi permettre de poser un diagnostic de causalité avec la recherche notamment d'anticorps anti-nucléaires, d'infection virales (VIH, hépatite B ou C), d'anomalies hépatiques (à confirmer avec une échographie abdominale) afin de rechercher une possible hypertension portale. Ces examens permettent également d'explorer un éventuel syndrome inflammatoire avec la mesure du taux de CRP (protéine C réactive).

- Diagnostic différentiel : classification du type d'HTP

En cas de suspicion d'HTP, un grand nombre d'examen cliniques et paracliniques sont nécessaires afin d'affiner le diagnostic et d'éliminer d'autres pathologies, on parle aussi de diagnostic différentiel. Il est important de bien différencier les différents types d'HTP car la prise en charge est très différente selon leur classification.

L'atteinte pré-capillaire est caractérisée par l'absence d'augmentation de la PAP d'occlusion (pression capillaire bloquée = PCWP < 15 mmHg). L'atteinte post-capillaire est caractérisée par l'augmentation de la PAP d'occlusion au-dessus de 15 mmHg (22) ; Tableau 1.

Définition	Caractéristique	Groupe(s) d'HTP
HTP	PAPm > 25 mm Hg	Tous
HTP pré-capillaire	PCWP < 15 mm Hg CO normal ou réduit	1. HTAP 3. HTP liée à une maladie pulmonaire 4. HTP post-embolique 5. HTP avec un mécanisme peu clair et/ou multifactoriel
HTP post-capillaire	PCWP > 15 mm Hg CO normal ou réduit	2. HTP liée à une maladie du cœur gauche

Tableau 1 : Diagnostic d'HTP pré- et post-capillaire

D'après (23)

PAPm = pression artérielle moyenne, PCWP = pression capillaire bloquée, CO = Cardiac output.

- Evaluation de la sévérité

Les signes cliniques observés dans l’HTP ne sont pas les mêmes selon de degré de gravité. Ce degré de gravité peut aussi conditionner la prise en charge thérapeutique. Il existe une classification établie par la NYHA (« New-York Heart Association ») qui s’appuie principalement sur l’atteinte dyspnéique ; Tableau 2.

Classe I

Patients atteints d’hypertension pulmonaire ne présentant pas de limitation de l’activité physique. Les activités physiques habituelles n’induisent pas de dyspnée ou de fatigue excessive, ni de douleurs thoraciques ou de sensations lipothymiques.

Classe II

Patients atteints d’hypertension pulmonaire, légèrement limités dans leur activité physique. Ces patients ne sont pas gênés au repos. Les activités physiques habituelles induisent une dyspnée ou une fatigue excessive, des douleurs thoraciques ou des sensations lipothymiques.

Classe III

Patients atteints d’hypertension pulmonaire, très limités dans leur activité physique. Ces patients ne sont pas gênés au repos. Les activités physiques mêmes légères induisent une dyspnée ou une fatigue excessive, des douleurs thoraciques ou des sensations lipothymiques.

Classe IV

Patients atteints d’hypertension pulmonaire, incapables de mener quelque activité physique que ce soit sans ressentir de symptômes. Ces patients ont des signes d’insuffisance cardiaque droite. Une dyspnée et/ou une fatigue peut être présente même au repos. Le handicap est augmenté par n’importe quelle activité physique.

Tableau 2 : Classification fonctionnelle de la dyspnée adaptée à l’HTAP (OMS, Evian 1998- Version modifiée de la classification NYHA)

D’après (18)

2.3. Classification

La classification de l'HTP a changé lors du symposium mondial d'Evian de 2004 sur l'HTP (24), au cours duquel une classification par pathologie a été adoptée. Elle a été complétée à Nice en 2013. Elle regroupe par classes les pathologies ayant les mêmes caractéristiques hémodynamiques, symptomatologiques et les mêmes prises en charges (11). Avant cela, les HTP étaient classées en fonction de leur caractère primitif, c'est à dire sans cause connue, ou secondaire à une autre pathologie.

Il existe 5 classes d'HTP ; Tableau 3.

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. HTAP idiopathique 1.2. HTAP héréditaire, familiale ou génétique <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. Gène BMPR2 1.2.2. Gène autre 1.3. Induite par la prise de toxines ou de médicaments 1.4. Associée à : <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Une connectivite 1.4.2. Une infection par le VIH 1.4.3. Une hypertension portale 1.4.4. Une cardiopathie congénitale 1.4.5. Une schistosomiase
1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire pulmonaire
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. Idiopathique 1.2. Héréditaire <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. Gène EIF2AK4 1.2.2. Gène inconnu 1.3. Induite par la prise de toxines ou de médicaments ou à une irradiation 1.4. Associée à : <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Une connectivite 1.4.2. Une infection par le VIH
1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né
2. Hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche
<ul style="list-style-type: none"> 2.1. Dysfonction systolique du ventricule gauche 2.2. Dysfonction diastolique du cœur gauche 2.3. Maladies valvulaires 2.4. Obstructions congénitales ou acquises au niveau du tract d'éjection ou de remplissage du ventricule gauche et cardiomyopathies congénitales
3. Hypertension pulmonaire (HTP) due à une maladie pulmonaire ou à une hypoxie chronique
<ul style="list-style-type: none"> 3.1. Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) 3.2. Maladie pulmonaire interstitielle 3.3. Autres maladies respiratoires avec un profil restrictif et obstructif mixte 3.4. Troubles d'apnée du sommeil 3.5. Hypoventilation alvéolaire 3.6. Exposition chronique aux hautes altitudes 3.7. Anomalies du développement pulmonaire
4. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique (CTEPH) et obstruction artérielle pulmonaire autre
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. CTEPH 1.2. Autre obstruction artérielle pulmonaire
5. Hypertension pulmonaire ayant des mécanismes multifactoriels incertains
<ul style="list-style-type: none"> 5.1. Troubles hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie 5.2. Troubles systémiques : sarcoïdose, lymphangioliéomyomatose, histiocytose à cellules de Langerhans pulmonaires 5.3. Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies 5.4. Divers : obstruction pulmonaire tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique, hypertension pulmonaire segmentaire

Tableau 3 : Classification de l'hypertension pulmonaire

D'après (17)

BMPR 2= Bone Morphogenic Protein Receptor type II; CAV1 = cavéoline-1; ENG = endogline; VIH = virus de l'immunodéficience humaine.

2.3.1. Groupe 1 : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

Le groupe 1 correspond au groupe de pathologies affectant les artères pulmonaires distales. Ces artères pulmonaires sont touchées par le remodelage, la vasoconstriction et l'inflammation. Ce groupe est caractérisé hémodynamiquement par une HTP pré-capillaire associée à une augmentation des RVP supérieure à 3 unités de Wood en l'absence d'autres causes possibles d'HTP pré-capillaire (13, 17, 25).

La prévalence de l'HTAP varie entre 10,6 et 26 cas par million d'habitants adultes selon les registres. L'incidence varie entre 2 et 7,6 cas par millions d'habitants adultes et par an (26). Selon le registre multicentrique français, la prévalence de l'HTAP est de 15 cas par million d'habitants de plus de 18 ans, et une incidence de 2,4 cas par million d'habitants et par an (27). Cependant, il est intéressant de remarquer que l'incidence de l'HTP (sans distinction de groupe) semble être en nette augmentation du fait du vieillissement de la population (14), dans une étude néerlandaise la prévalence de l'HTP atteignait jusqu'à 8,3% de la population âgée de plus de 85 ans (28).

Le ratio femmes/hommes est de 1,6 pour ce registre français (27). Le diagnostic de l'HTAP reste tardif (50 ans environ) malgré les récents progrès techniques (12).

La survie est réduite : en France, elle est de 58,2% à 3 ans et de 67% à 2 ans (29). Le registre américain REVEAL a pu montrer que le pronostic à 5ans restait faible malgré les traitements, et que le score de la NYHA du patient au moment du diagnostic pourrait être un facteur pronostique important (30).

Des facteurs de risque ont pu être mis en évidence dans l'HTAP, tels que des risques iatrogènes et toxiques, des conditions démographiques ou encore certaines pathologies médicales ; Tableau 4.

Iatrogènes et toxiques

- Prouvé ou très probable :
 - Anorexigènes : Aminorex, dérivés de la fenfluramine ;
 - Amphétamines ;
 - L-tryptophane.
 - Possible :
 - Cocaïne ;
 - Méta-amphétamines ;
 - Chimiothérapie.
-

Conditions démographiques

- Prouvé ou très probable :
 - Sexe féminin ;
 - Grossesse ;
 - Hypertension artérielle systémique
 - Possible :
 - Obésité
-

Pathologies médicales

- Prouvé ou très probable :
 - Infection par HIV ;
 - Hypertension portale / Atteinte hépatique chronique ;
 - Connectivite ;
 - Cardiopathie congénitale avec shunt
 - Possible :
 - Pathologies thyroïdiennes.
-

Tableau 4 : Facteurs de risque des HTAP

D'après (18)

Les pourcentages de chaque sous-population de groupe 1 sont tirés du travail de Humbert *et al.* (27) ; Tableau 5.

Sous-type d'HTAP	Fréquence exprimée en pourcentage des HTAP
HTAP idiopathique	39,2 % des HTAP
HTAP héréditaire, familiale ou génétique	3,9 % des HTAP
HTAP induite par la prise de médicaments ou de drogues	9,5 % des HTAP
HTAP associée aux connectivites	15,3 % des HTAP
HTAP associée à l'infection par le VIH	6,2 % des HTAP
HTAP associée à l'hypertension portale	10,4 % des HTAP
HTAP associée à des maladies cardiaques congénitales	11,3 % des HTAP
HTAP associée une schistosomiase	

Tableau 5 : Les sous-types d'HTAP et leur fréquence au sein des HTAP
D'après (27)

Le diagnostic de l'HTAP idiopathique ne peut être posé qu'après avoir effectué tous les tests afin d'éliminer toute étiologie possible. La place du diagnostic différentiel est donc prépondérante, car « idiopathique » signifie sans cause connue. Ce type d'HTAP est généralement sévère, avec des valeurs de PAPm très élevées, et présente un score de la NYHA de III ou IV (31). La survie de ce sous-groupe d'HTAP à 3 ans est moins élevée que chez l'ensemble des HTAP : 58% contre 67% (27).

2.3.2. Groupe 1' : Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO) et hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP)

La MVO et la HCP sont des causes rares d'HTAP, et leur prévalence exacte n'est pas connue. Ces maladies ne touchent pas les artères mais la circulation en aval soit respectivement les veines et les capillaires pulmonaires.

Ces maladies ne se différencient pas hémodynamiquement de l'HTAP. Par contre, elles se différencient de l'HTAP par leurs diagnostics, pronostics et prises en charge. Pour confirmer leurs diagnostics, il faut pratiquer une étude anatomopathologique mais les biopsies pulmonaires sont contre-indiquées chez les patients souffrant d'HTP. Il est toutefois possible d'adopter une approche non invasive en utilisant la tomodensitométrie thoracique : on observe alors des opacités en verre dépoli centrolobulaires, des lignes septales, des adénopathies médiastinales. L'hypoxie de repos et la chute de la diffusion libre du monoxyde de carbone (DLCO) sont plus sévères que chez les patients atteints d'HTAP idiopathique (32).

Le diagnostic de ces patients est très important, et il ne doit pas être confondu avec des HTAP « classiques » car l'initiation d'un traitement spécifique de l'HTAP, de par son action vasodilatatrice, risque d'entraîner un œdème aigu du poumon. Le pronostic sombre et l'absence de traitement pharmacologique adéquat laisse une seule possibilité de prise en charge thérapeutique pour cette catégorie d'HTAP : la transplantation pulmonaire.

2.3.3. Groupe 1'' : Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né (PPHN)

La PPHN est une cause fréquente d'admission en réanimation néonatale. Les résistances vasculaires post-natales sont élevées et diminuent progressivement dans le cas normal. Dans la PPHN, il y a une persistance des résistances vasculaires, ce qui entraîne un déficit d'oxygénation et une dysfonction du ventricule droit, pouvant même entraîner la mort (33).

2.3.4. Groupe 2 : Hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche

La cardiopathie gauche diminue le débit cardiaque gauche. Le sang est moins bien pompé hors du poumon (augmentation de la pré-charge du cœur gauche). Cela entraîne une augmentation de la post-charge du cœur droit, et une augmentation des pressions de toute la circulation pulmonaire.

Les cardiopathies gauches sont liées à différentes pathologies : dysfonction systolique ou diastolique ventriculaire gauche, maladie des valves, ou maladie congénitale.

L'atteinte post-capillaire peut être soit qualifiée « d'HTP post-capillaire isolée » lorsque le gradient de pression transpulmonaire (PAPd – PCWP) est inférieur ou égal à 7 mmHg, soit qualifiée « d'HTP post-capillaire avec une composante pré-capillaire » (anciennement appelée « hors de proportion ») lorsque ce gradient est supérieur à 7 mmHg (17, 34) ; Tableau 6.

Terminologie	PCWP	dPAP-PCWP	RVP
HTP post-capillaire isolée	> 15 mm Hg	< 7 mm Hg	≤ 3 WU
HTP post-capillaire avec une composante pré-capillaire	> 15 mm Hg	≥ 7 mm Hg	> 3 WU

Tableau 6 : HTP associée à des maladies du cœur gauche

D'après (17)

PAPm = pression artérielle pulmonaire moyenne, dPAP = pression artérielle pulmonaire diastolique, PCWP = pression capillaire bloquée, RVP = résistance vasculaire pulmonaire, WU = unité de Wood.

La prise en charge de cette HTP doit d'abord cibler la maladie du cœur gauche responsable de l'HTP, et consiste à corriger l'anomalie causale (par exemple : réparation de l'anomalie valvulaire) afin d'améliorer la contractilité ventriculaire gauche.

2.3.5. Groupe 3 : HTP associée à une maladie pulmonaire et/ou à l'hypoxie

Ce groupe appartient aux HTP pré-capillaires et comprend toutes les causes d'origine pulmonaire entraînant une hypoxie alvéolaire. L'HTP est donc corrélée aux fonctions respiratoires, et à l'oxygénation du sang. La prise en charge de l'HTP dans ce groupe est l'oxygénothérapie. Elle est accompagnée des traitements éventuels de l'étiologie de l'HTP (ex : bronchodilatateurs pour la BPCO). Ce groupe appartient aux HTP pré-capillaires. Dans ce groupe, il existe 7 causes identifiées pouvant entraîner une HTP (11) :

- BPCO
- Maladie interstitielle du poumon
- Autre maladie pulmonaire avec une combinaison de syndromes restrictifs et obstructifs
- Apnée du sommeil
- Désordre d'hypoventilation alvéolaire
- Séjour chronique en haute altitude
- Maladie pulmonaire

L'HTP est une complication relativement fréquente des maladies hypoxémiantes (35). Or, l'HTP secondaire à une BPCO est associée avec un mauvais pronostic et une mauvaise qualité de vie (36). La prévalence de l'HTP dépend de la sévérité de la maladie, elle survient plus souvent chez les BPCO avancés, c'est à dire quand il y a une limitation sévère des fonctions respiratoires et/ou une hypoxie (37, 38). Un grand intérêt actuel est porté à la compréhension des mécanismes en cause dans le développement de l'HTP secondaire à une BPCO. L'hypoxie semble être une cause sérieuse (39-41). Par contre, de manière surprenante, il n'existe pour le moment aucun argument permettant de dire que l'emphysème pourrait également en être la cause. En effet, aucune corrélation n'a été trouvée entre la mesure de la PAPm et la quantification de l'emphysème (41-44). Par ailleurs le remodelage bronchique est aussi un facteur important dans la BPCO, qui se développe de manière indépendante à l'emphysème (45-48). En fait, l'emphysème et la perte des propriétés élastiques sont associés à la destruction protéolytique du parenchyme pulmonaire, alors que le remodelage bronchique provient de la fibrose et/ou de l'inflammation bronchique chronique.

Ce groupe 3 d'HTP n'entraîne généralement pas d'augmentation de la PAPm au-dessus de 35 mmHg, soit une HTP modérée. Or il existe, parmi les patients atteints de BPCO ou de fibrose idiopathique pulmonaire, une sous-population de patients avec une augmentation très importante de la PAPm (> 35 mmHg) (37). Ces sous-populations étaient qualifiées de « hors de proportion » ; ce terme a été remplacé par « sévère ». Dans la population des patients atteints de BPCO, la fréquence de cette sous-population d'HTP sévère varie entre 5% (41) et 13% (40). Cette sous-population serait plus facilement sujette à des hypoxies, des hypocapnies et à une diminution de la diffusion libre du monoxyde de carbone (DLCO). De plus, aucun des facteurs communément admis pour expliquer la BPCO ne corrélait avec la PAPm chez ces patients (39). Une hypothèse de phénotype distinct a alors été émise pour expliquer cette sévérité de valeurs de pression chez les patients atteints de BPCO. Ce phénotype pourrait être d'avantage lié à une altération des artères pulmonaires qu'à une altération des voies respiratoires (49). Une seule étude s'était déjà intéressée à l'évaluation des petits vaisseaux chez les patients souffrant de BPCO avec un emphysème sévère associés à une HTP modérée (42). Dans cette étude, la PAPm n'excédait pas le seuil de 40 mmHg. Aucune étude n'avait donc encore été menée sur l'étude *in vivo* des petits vaisseaux dans la sous-population de patients souffrant de BPCO associée à une HTP sévère.

2.3.6. Groupe 4 : HTP post-embolique chronique (CTEPH)

L'HTP post-embolique chronique (CTEPH) est causée par une obstruction chronique proximale et/ou distale des artères pulmonaires d'origine thromboembolique. La CTEPH est une cause d'HTP pré-capillaire potentiellement curable, d'où l'importance de diagnostiquer de manière précise ces formes d'HTP à l'aide de la scintigraphie de ventilation/perfusion et de la tomodensitométrie. Lorsque l'embolie est situé au niveau des artères pulmonaires proximales, il est possible d'effectuer une thromboendartériectomie dans des centres de référence. Lorsque l'embolie est situé dans les artères pulmonaires distales, et que le recours à une endartériectomie n'est plus possible, les traitements pharmacologiques sont alors envisagés (50). Récemment, une molécule a obtenu l'AMM dans le traitement de la CTEPH : le riociguat (stimulateur direct de la guanylate cyclase soluble), qui permet de diminuer les résistances vasculaires périphériques (51). Les patients peuvent aussi être traités par anticoagulants.

2.3.7. Groupe 5 : HTP dont le mécanisme est multifactoriel et incertain

Le groupe 5 est constitué de formes diverses d'HTP pour lesquelles les causes sont multifactorielles ou manquent encore de clarté (52). Une HTP classée dans ce groupe peut par exemple être causée par un sepsis ou être la conséquence d'une chirurgie cardiothoracique.

2.4. Mécanismes physiopathologiques

Différents mécanismes physiopathologiques sont mis en jeu pendant le développement de l'HTP. Il est intéressant de noter qu'actuellement deux hypothèses sont avancées concernant la chronologie des événements conduisant au développement de l'HTP. L'hypothèse la plus étudiée propose que les mécanismes physiopathologiques, tels que l'inflammation, la vasoréactivité, et le remodelage artériel pulmonaire précèderaient l'augmentation de la PAPm. Toutefois, un travail récent a démontré la possibilité de limiter le remodelage artériel par diminution mécanique de la PAPm, ce qui permet d'envisager au contraire que le stress hémodynamique précèderait les autres mécanismes physiopathologiques observés dans l'HTP (53).

2.4.1. Inflammation

L'inflammation au niveau des artères pulmonaires est un élément important de la physiopathologie de l'HTP, et est particulièrement décrite dans la littérature en cas d'HTAP. Cette inflammation est causée à la fois par des facteurs solubles et par des cellules immunologiques spécialisées dans les réponses inflammatoires (54). Des cellules inflammatoires, le plus souvent des lymphocytes, sont infiltrées au niveau périvasculaire, et cette infiltration périvasculaire est corrélée avec le remodelage vasculaire dans l'HTAP (55).

Une élévation bien documentée de la concentration de nombreuses cytokines a été observée dans l'HTAP, telles que le facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor = TNF- α), les interleukines (IL) -1 β , -2, -4, -6, -8, -10, -12p70 (56, 57). Cette élévation est même corrélée à la mortalité pour certaines cytokines. Ainsi les IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, et

IL-12p70 sont des prédicteurs de survie. De plus, le taux de TNF- α est corrélé positivement avec l'index cardiaque (CI) (57). L'index cardiaque est égal au quotient du débit cardiaque par la surface corporelle et s'exprime donc en l / mn / m² de surface corporelle, permet donc de comparer le débit cardiaque de sujets de taille différente. Enfin, l'élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 serait positivement corrélée avec la mortalité (57, 58). Les taux de certaines cytokines inflammatoires comme la CRP, le TNF- α (59) et IL-6 (44) sont également plus élevés chez les patients atteints d'HTP associée à la BPCO.

De plus, dans l'HTP, on observe une augmentation d'expression de chimiokines, telles que les chimiokines motif C-X-C ligand 1 (CXCL1) ou 13 (CXCL13), ou les chimiokines motif C-C ligand 2 (CCL2), 19 (CCL19) ou 21 (CCL21) (54, 60-63). Ces chimiokines ont la capacité d'attirer les cellules inflammatoires et peuvent ainsi participer au remodelage dans l'HTP et l'HTAP. Par exemple, la chimiokine CCL2 est impliquée dans la migration des monocytes et le remodelage artériel pulmonaire dans l'HTAP (62).

On observe une augmentation de l'infiltration des cellules inflammatoires au niveau des tissus. Plus précisément, on constate une augmentation de l'infiltration périvasculaire de macrophages (CD 68+), de macrophages/monocytes (CD 14+), de mastocytes, de cellules dendritiques (CD 209+), de lymphocytes T (LT) (CD 3+), de LT cytotoxiques (CD 8+), de LT « helper » (CD 4+) chez les patients HTAP en comparaison aux patients contrôles (64). Localement, on observe une diminution des LT régulateurs (64), alors que dans la circulation générale, on observe une augmentation de ces LT régulateurs (Fox P3 +) chez les patients souffrant d'HTAP idiopathique (65, 66). Cette diminution locale pourrait être expliquée par une diminution du recrutement des LT régulateurs par les poumons. Ces LT régulateurs ayant un rôle de contrôle de l'inflammation, cela pourrait expliquer un emballement immunitaire (54). D'autres cellules sont impliquées dans l'inflammation observée dans l'HTAP, comme par exemple les cellules « natural killer » qui sont dysfonctionnelles (67).

Le recrutement des cellules inflammatoires fait débat : la première hypothèse « inside-out » voudrait que les cellules proviennent du sang et s'infiltrerent par l'intima pour diffuser dans les vaisseaux. La seconde hypothèse, « outside-in », s'appuie sur l'apparition précoce de cellules inflammatoires au niveau de l'adventice, pour suggérer que l'adventice serait la première couche de cellules infiltrée par les cellules inflammatoires (54).

2.4.2. Altérations de la réactivité pulmonaire

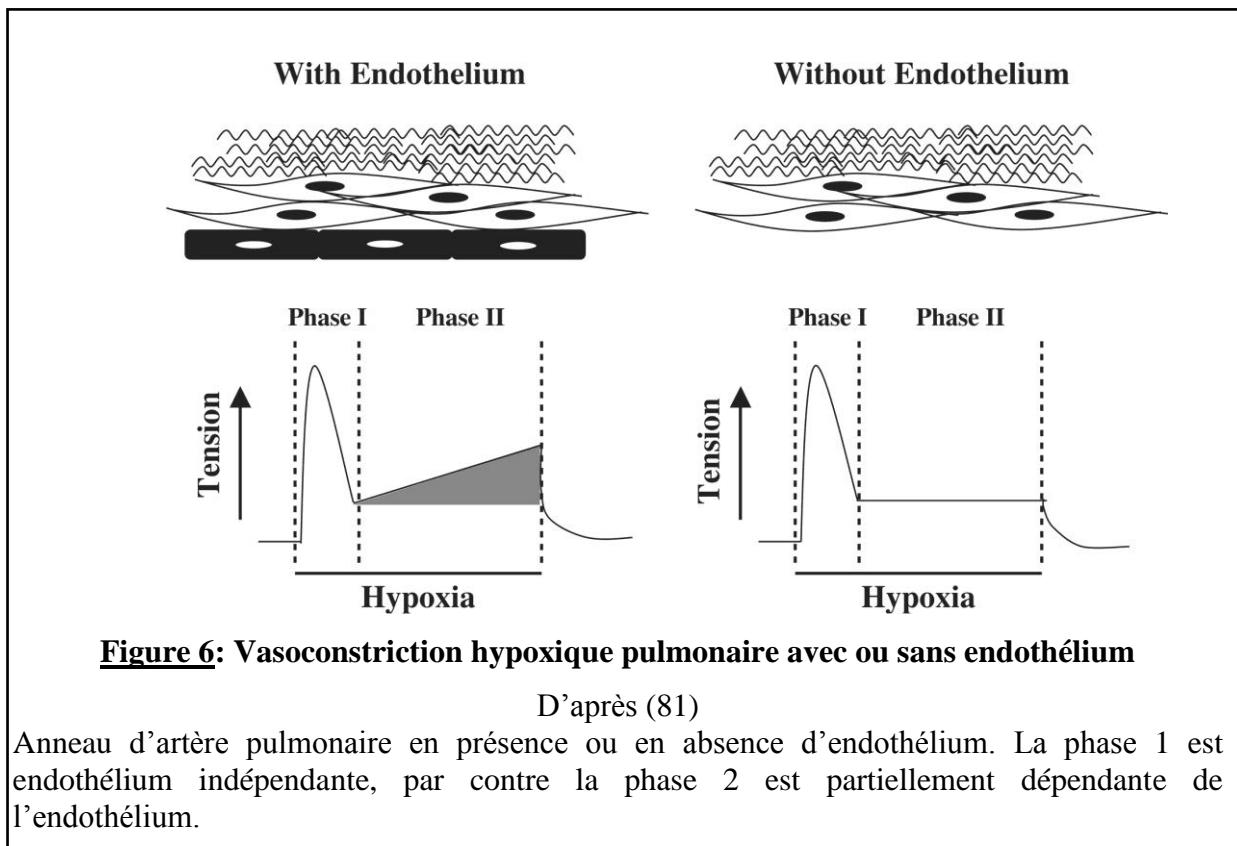
Chez les sujets atteints d'HTP, on observe une hyperréactivité vasculaire pulmonaire (68). Un déséquilibre est constaté entre les molécules vasoconstrictrices, dont la concentration est augmentée (thromboxane A₂, sérotonine, endothéline-1) et les molécules vasodilatatrices, dont la concentration est diminuée (monoxyde d'azote = NO, prostacycline...) (69). Ce déséquilibre entraîne une augmentation du tonus myogénique pulmonaire (70). Dans l'HTP, les artères pulmonaires sont contractées au repos, ce qui contribue à la diminution du calibre des vaisseaux (71). Ceci peut être dû à différents facteurs, en particulier à une altération de l'endothélium ou à l'activité modifiée de nombreux canaux ioniques.

Les artères pulmonaires dans l'HTP présentent une altération de leur réactivité à des agents vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 (72, 73), la sérotonine (74), l'angiotensine II (75), la phényléphrine, ou la prostaglandine F_{2α} (76). Ces phénomènes précoces ont été bien caractérisés dans les modèles animaux d'HTP (77). Cela s'explique en partie par l'altération de l'endothélium qui change d'état dans l'HTP : il passe d'un état quiescent à un état activé et migratoire. L'altération de l'endothélium amoindrit sa capacité à produire des médiateurs vasodilatateurs comme le NO ou la prostacycline. De plus, l'endothélium libère davantage de molécules vasoconstrictrices telles que l'endothéline ou la sérotonine.

Lors de l'HTP, on observe une augmentation du tonus myogénique due à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire de repos dans les CML des artères pulmonaires (70, 78, 79). Cette augmentation du calcium intracellulaire, mise en cause dans l'augmentation de la vasoconstriction dans l'HTP, peut être expliquée par différents mécanismes. Les canaux potassiques voltage-dépendants peuvent subir dans l'HTAP une diminution de leur activité liée à un changement de leur expression et/ou de leur fonction. Une diminution de l'expression de la sous-unité alpha de ces canaux voltage-dépendants (78, 80) peut par exemple être observée dans l'HTAP. Le potentiel de membrane de repos est moins négatif, et le courant dépendant des canaux potassiques est diminué (80).

La vasoconstriction hypoxique est un autre phénomène mis en jeu lors de l'HTP. Il s'agit d'une réaction biphasique en réponse à l'hypoxie des petites artères pré-contractées (81). La première phase contractile est transitoire, la seconde est progressive et maintenue. C'est cette deuxième phase qui pourrait entraîner une élévation de la PAPm, quand l'hypoxie

est prolongée. Des expériences ont pu démontrer qu'en absence d'endothélium dans les artères pulmonaires, il n'y a pas de modification de la phase 1, par contre l'augmentation de la réponse contractile de la phase 2 est amoindrie (81) ; **Figure 6**. Ces résultats suggèrent que pendant la phase 2, l'endothélium est impliqué via des mécanismes de sensibilisation de l'appareil contractile des CML (82). Pendant cette phase, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ne semble dépendre que de la présence de calcium intracellulaire du fait de l'activation des récepteurs à la ryanodine qui pourrait être due à la synthèse d'ADP-ribose cyclique induite par l'hypoxie (82).



2.4.3. Remodelage vasculaire pulmonaire

Le remodelage est un aspect physiopathologique progressif et tardif des artères pulmonaires. Ce remodelage peut être observé pour des artères de moins de 500 μ m (18, 83), il est un aspect irréversible de la maladie sans intervention médicale.

Le remodelage dans l'HTP a été plus souvent étudié dans le sous-groupe d'HTAP. D'après Heath et Edwards (83), il existe 6 stades (ou grades) d'HTAP. En fonction de la gravité de l'HTAP, on distingue différents types de lésions au niveau des artères pulmonaires. Depuis longtemps, on a observé que les lésions artérielles de l'HTAP sont évolutives en fonction du stade et de la gravité de la maladie ; Tableau 7. Cette classification a été reprise dans d'autres sous-types d'HTP (84).

	Stades d'HTAP					
	1	2	3	4	5	6
Type de réaction endothéliale	rien					
		Cellulaire				
		Fibreuse et fibroélastique				
		« Lésion plexiforme »				
Etat de la media	hypertrophie					
			Quelques dilatations généralisées			
			Lésion de dilatation locale			
					HP #	
						AN*

Tableau 7 : Les grades d'HTAP en fonction du remodelage artériel pulmonaire
D'après (83)
*HP = Hémosidérose pulmonaire, # AN = artérite nécrosante

➤ Dans un premier temps on observe une **hypertrophie de la media**. Elle consiste en un épaissement de la media et une muscularisation des petites artères normalement dépourvues de media (85). Cette hypertrophie de la media est observée pour tous les types d'HTP (19).

➤ Un épaissement de l'**intima**, à cause de la présence, au niveau de l'intima, de fibroblastes, de myofibroblastes, de CML et de cellules inflammatoires (18). On peut observer des lésions intimales qui se développent suite à l'agression de l'endothélium. On peut également observer un envahissement de la lumière du vaisseau par l'intima, on parle même de « néointima » ; Figure 7, mettant en jeu la prolifération et/ou la migration des CML et des fibroblastes ainsi qu'une néogenèse lymphoïde pulmonaire (86).

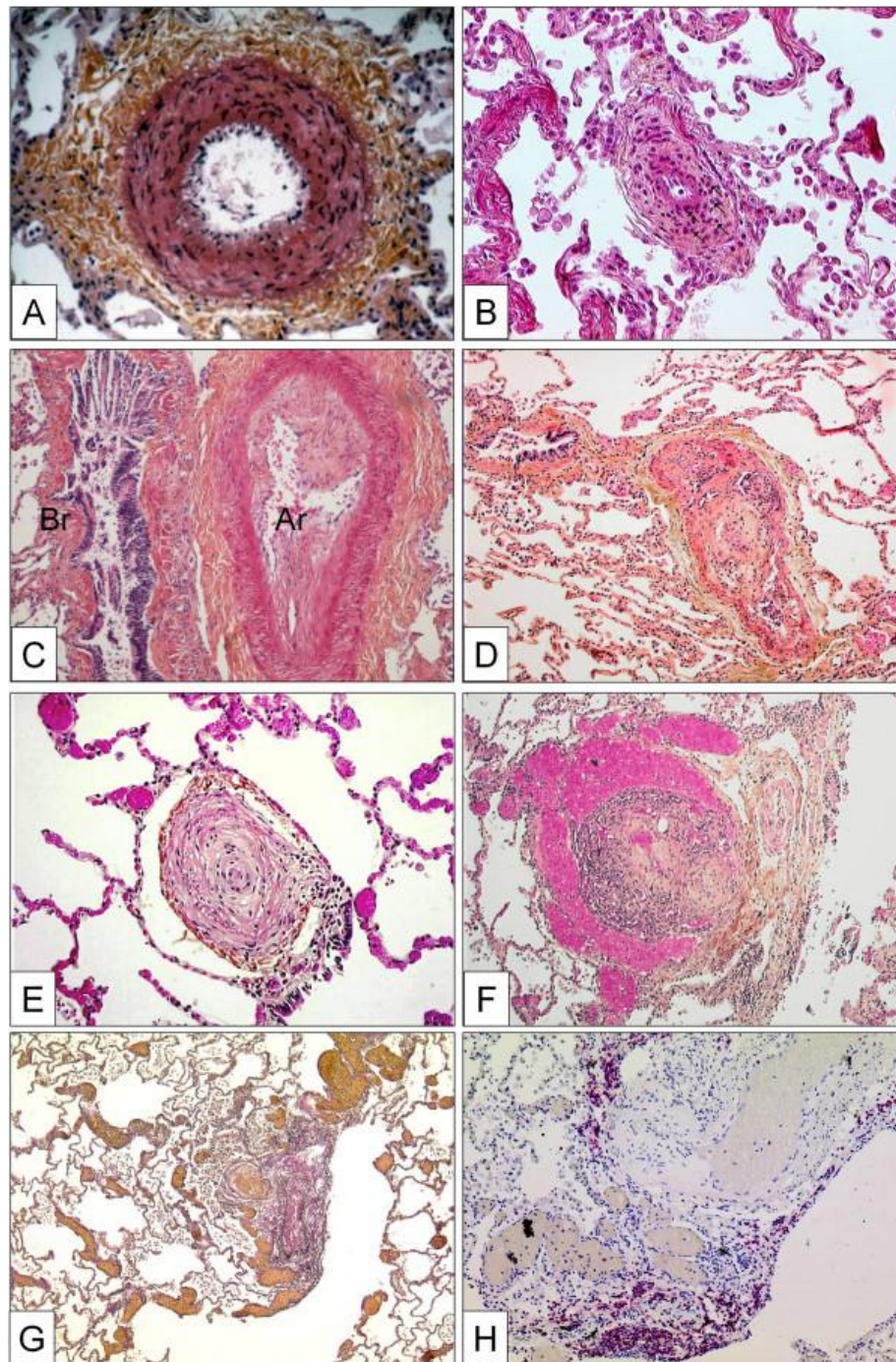


Figure 7 : Artères pulmonaires muscularisées de patients atteints d'HTAP

D'après (19)

A, Hypertrophie de la media avec prolifération des CML et fibrose de l'adventice ; B, Fibrose intimale concentrique non laminaire comprenant une infiltration de myofibroblastes ; C, Fibrose intimale excentrique (BR : Bronche, Ar : artère) ; D, Lésion thrombotique appelée lésion « Colander-like » ou lésion de Colander avec une recanalisation partielle par des microvaisseaux (très proche des lésions plexiformes) ; E, Fibrose intimale concentrique laminaire ou « en bulbe d'oignon » ; F, Lésion plexiforme avec une prolifération des petits vaisseaux sinusoides sur une matrice fibrotique ; G, Lésions de dilatation entourant une lésion plexiforme ; H, La même lésion après une coloration immunohistochimique avec un marquage anti-CD3 (marquage des Lymphocyte T).

On observe différents types de lésions endothéliales :

- Les lésions de fibrose thrombotique

L'altération de l'endothélium engendre un état prothrombotique local. Cette thrombose pourra entraîner la libération de médiateurs et activer certaines cellules impliquées dans le remodelage artériel pulmonaire. On peut alors observer des dépôts de fibrine ; Figure 7, Figure 8.

- Les lésions de fibrose intimale concentrique laminaire

Ces lésions ont un aspect dit en « bulbe d'oignon », et sont formées de couches concentriques successives de cellules entourées par des fibres élastiques et de collagène (84, 87, 88)

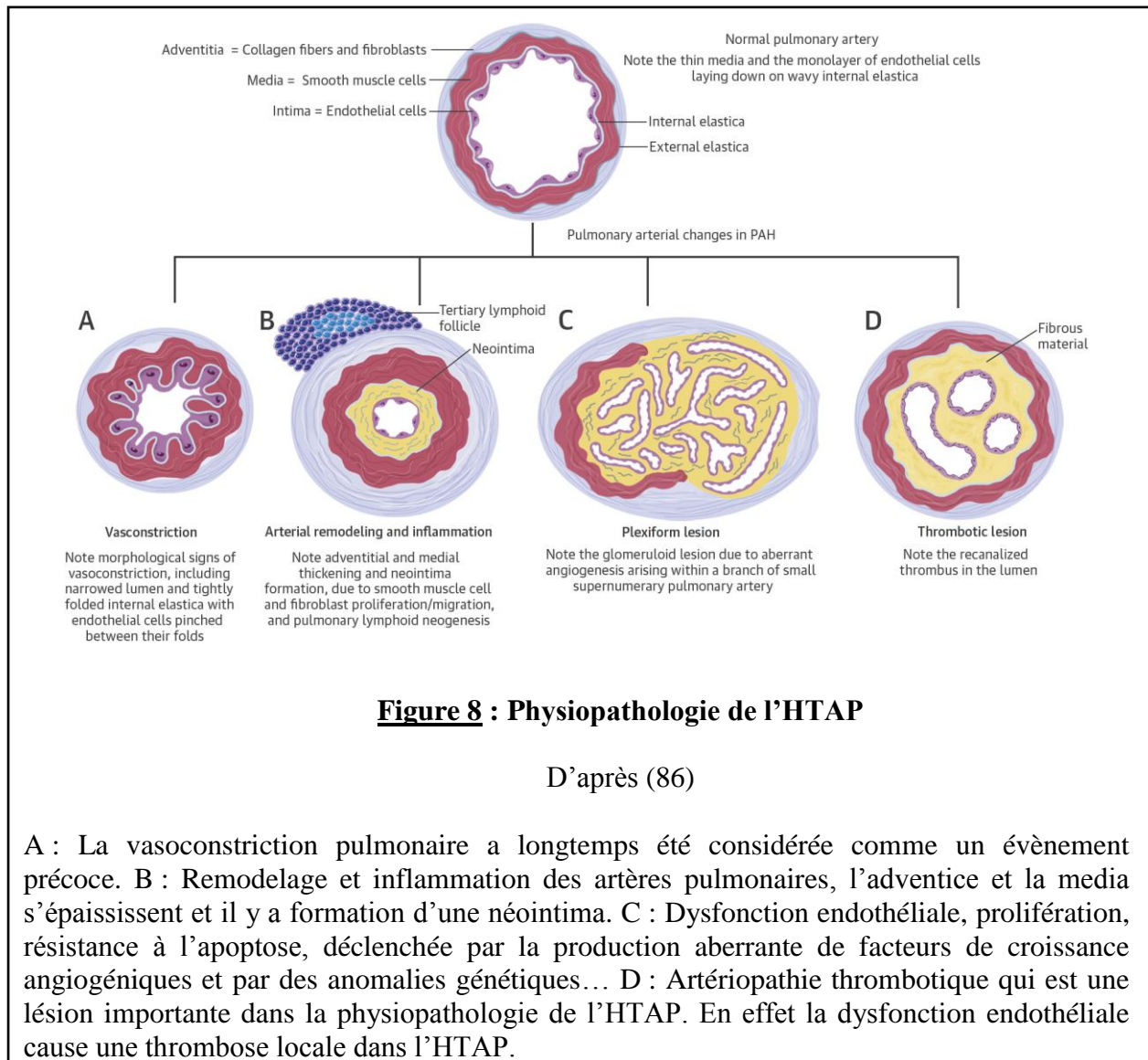
- Les lésions de fibrose intimale concentrique non laminaire

Les lésions de fibrose concentrique non laminaire et les lésions excentriques sont principalement composées d'un agencement de cellules (beaucoup de fibroblastes d'après *Pietra et al*) entourées de fibres élastiques et de collagène (87, 89).

- Les lésions de fibrose intimale excentrique

Lorsque l'épaississement de l'intima n'atteint qu'un segment de la paroi du vaisseau, on parle de remodelage excentrique (89).

On a longtemps pensé que ces lésions, causant un épaississement endothélial, étaient le signe d'une artériopathie thromboembolique. Ce n'est plus le cas à présent (90). En effet, ce type de lésions peut être causé par d'autres facteurs, comme les facteurs de croissance ou un stress hémodynamique (87).



➤ Dans les formes plus évoluées d'HTP, des **lésions complexes** peuvent apparaître (91) :

○ **Lésions plexiformes**

Pour Abe *et al.*, les lésions plexiformes sont des lésions complexes et désorganisées, formées par un réseau ou un plexus de canaux. Ces canaux sont bordés par des cellules endothéliales et séparées par des éléments cellulaires (92). Pour l'équipe de Pietra, la lésion plexiforme est une prolifération localisée de l'intima bordée par des myofibroblastes, des CML et de la matrice extracellulaire (87). Cette lésion obstrue le plus souvent la lumière vasculaire par de nombreux éléments cellulaires, de la matrice extracellulaire et un réseau de micro-vaisseaux. Il y a une extension de la lésion et une destruction localisée de la paroi

artérielle pulmonaire, qui peut même s'étendre jusque dans le tissu conjonctif périvasculaire. Dans la lésion plexiforme, des thrombi de fibrine et de plaquettes peuvent fréquemment se développer. Cette lésion est souvent observée juste en aval d'une bifurcation artérielle. La fréquence de l'apparition de ces lésions est difficile à estimer (89).

Il existe deux types de lésions plexiformes : les lésions de type anévrysmal, se développant en s'étendant au-delà des limites du vaisseau (« Aneurysm-like ») et les lésions se développant à l'intérieur du vaisseau (« Stalk-like » ou « Bud-like ») (92).

Les lésions plexiformes ne sont plus considérées comme étant spécifiques de l'HTAP sévère, mais d'avantage comme d'une HTP sévère pré-capillaire (89, 93). Elles auraient aussi été observées dans les HTP causées par des BPCO (84) et dans la CTEPH (87, 94). Toutefois, il est difficile de différencier les lésions plexiformes des lésions de Colander (« Colander-like ») qui correspondent à la recanalisation d'un vaisseau suite à un thrombus (87).

Les lésions plexiformes ont un phénotype distinct des autres lésions vasculaires de par leur composition cellulaire et micro-environnementale. Certains gènes sont surexprimés, comme les gènes HIF1 α , TGF- β 1, VEGF, VEGFR-1/-2, Ang-1, Tie-2, THBS1, c-KIT. Parfois, des marqueurs associés au remodelage peuvent aussi être suractivés, tels que la protéine NOTCH ou des métalloprotéinases de matrice (95).

○ Lésions de dilatation

Il s'agit de lésions ressemblant à des vaisseaux, ou « vein-like ». Comme leur nom l'indique, leur paroi est fine. Elles sont localisées à distance des lésions plexiformes. Elles peuvent être à l'origine d'hémorragies pulmonaires et à l'origine de l'apparition secondaire de réorganisation artérielle et de fibrose (87).

○ Lésions d'artérite

Elles correspondent à un stade évolué de l'HTP, et sont des lésions inflammatoires et nécrosantes des petites artères (18). Elles sont souvent associées à d'autres lésions complexes. La paroi vasculaire peut être nécrotique avec des infiltrations de fibrine ou de cellules inflammatoires (87).

➤ La transition endothélio-mésenchymateuse

Les changements structuraux des artères pulmonaires observés lors de l'HTAP sont accompagnés d'une augmentation du nombre de cellules exprimant le marqueur α -actine du

muscle lisse (96). Ces cellules peuvent avoir des origines diverses. Pendant longtemps, l'hypothèse classiquement avancée pour expliquer ce phénomène suggérait que ces cellules avaient pour origine des CML résidentes en prolifération ou des fibroblastes adventitiels différenciés en myofibroblastes (87). Une autre hypothèse plus récente suggère que les cellules endothéliales pourraient migrer depuis l'endothélium vers le sous-endothélium, en perdant progressivement leur phénotype endothélial pour acquérir un phénotype mésenchymateux plus invasif et prolifératif (97, 98).

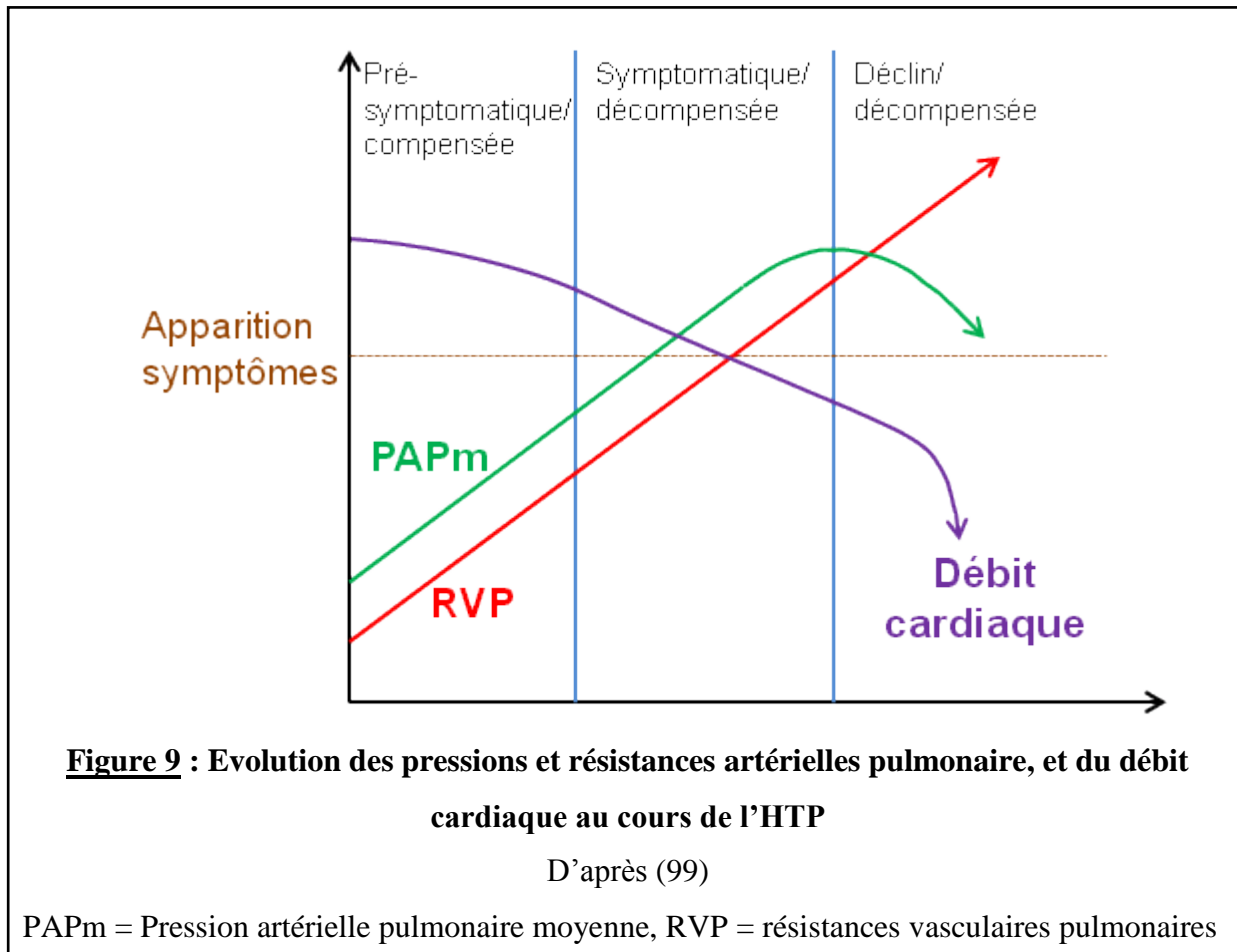
➤ Modifications de l'**adventice**

L'épaississement de l'adventice est difficile à évaluer du fait de sa limite externe difficile à identifier. Il semblerait que l'adventice serait elle aussi épaissie et plus fibreuse dans l'HTP (83). De plus, l'adventice serait le siège d'un recrutement important de cellules inflammatoires.

2.4.4. Facteur de gravité : le remodelage cardiaque

Suite à l'augmentation des résistances au niveau des artères pulmonaires, une hypertrophie cardiaque droite se développe et peut entraîner une insuffisance cardiaque droite, puis, à terme, le décès du patient atteint d'HTP. L'état du VD est un facteur clé du pronostic des patients atteints d'HTP (86).

Dans le développement des anomalies cardiaques, on observe d'abord la mise en place de mécanismes compensateurs. Un mécanisme compensateur, le remodelage cardiaque, a pour but de maintenir un débit constant, en augmentant la force de contraction cardiaque ; on parle d'insuffisance cardiaque compensée. Petit à petit, le cœur remanié devient de plus en plus gros et mou, et il est alors dans l'incapacité d'assurer les débits de manière correcte ; on constate alors les premiers symptômes et on parle d'insuffisance cardiaque décompensée. Enfin vient le déclin cardiaque où le cœur ne fournit plus des débits suffisants pour assurer une pression normale dans les artères pulmonaires, ce qui conduit au décès du patient (99, 100) ; Figure 9.



Toutefois, Bogaard *et al* ont montré que cette augmentation des pressions, seule, n'explique pas l'atteinte cardiaque. Elle doit être accompagnée d'un remodelage au niveau des artères pulmonaires. Ainsi un modèle mécanique d'HTP où on cesse d'irriguer un lobe du poumon afin d'augmenter la pression dans l'artère pulmonaire restante n'entraîne pas de remodelage vasculaire important et ne modifie pas de manière très importante le débit cardiaque, la fibrose cardiaque ou le diamètre interne du ventricule droit en comparaison avec les contrôles. Par contre, dans un modèle d'HTAP chez le rat associé à un remodelage vasculaire important, ces paramètres cardiaques sont altérés. Ces résultats remettent en question l'explication selon laquelle l'insuffisance cardiaque droite était uniquement due à l'augmentation des post-charges (101).

Ce remodelage cardiaque progressif et irréversible peut être expliqué par l'évolution de la fibrose pendant l'HTAP (8, 102, 103). Cet aspect de fibrose est très difficile à guérir, ce qui pose un réel problème dans le traitement de l'HTP.

3. Traitements, problématiques actuelles et nouvelles pistes d'étude de l'HTP

3.1. Traitements actuels

Pour chaque type d'HTP, les traitements et la prise en charge sont différents. Il n'existe actuellement aucun traitement pharmacologique curatif de l'HTP.

3.1.1. Objectifs et stratégie thérapeutique

Les objectifs du traitement sont de cibler les facteurs liés au pronostic des patients atteints d'HTP. Il faut donc suivre les marqueurs liés à la survie et à la qualité de vie des patients. Les premiers facteurs connus pour être corrélés et prédire l'évolution de ces patients sont la pression ventriculaire droite, la PAPm, et l'index cardiaque. D'autres tests non invasifs ont par la suite pu être utilisés, tels que le test de marche de 6 minutes (6MWT) et la classe fonctionnelle de la NYHA (104).

Il a été proposé, lors du symposium mondial de l'HTP de Nice en 2013, d'adopter pour objectifs thérapeutiques différents paramètres : une classe fonctionnelle de la NYHA entre I et II, une valeur de 6MWT au moins comprise entre 380 et 420 m, un test de mesure du pic de la consommation d'oxygène sous exercice cardiopulmonaire supérieur à 15 ml/min/Kg, un équivalent ventilatoire de CO₂ inférieur à 45 l/min/l/min, un taux de BNP (peptide natriurétique B) normal, une échographie et/ou une résonance cardiaque magnétique permettant d'observer une taille et une fonction du ventricule droit normales ou presque, des valeurs hémodynamiques se rapprochant des valeurs normales avec des valeurs de pression atriale droite inférieures à 8 mmHg et enfin un index cardiaque au moins compris entre 2,5 et 3 l/min/m² (104). Les recommandations des sociétés européennes respiratoires (ERS) et de cardiologie (ESC) en 2015 gardent comme objectifs à évaluer la classe de la NYHA, le taux de NT-proBNP, l'index cardiaque élevé et de bonnes capacités à l'effort. En 2015, le terme de « low-risk » apparaît dans les recommandations, terme qui correspond à un risque faible de

mortalité à 1 an, en prenant en compte les différents paramètres énumérés en 2013 lors du symposium de Nice (17)

Il existe un algorithme de la prise en charge thérapeutique de l'HTAP. Cet algorithme comprend une approche thérapeutique pharmacologique, chirurgicale, mais prend aussi en compte le mode de vie et la prévention des éventuelles complications ; Figure 10.

Toutefois cet algorithme n'est pas très adapté aux HTP des groupes 2 et 3.

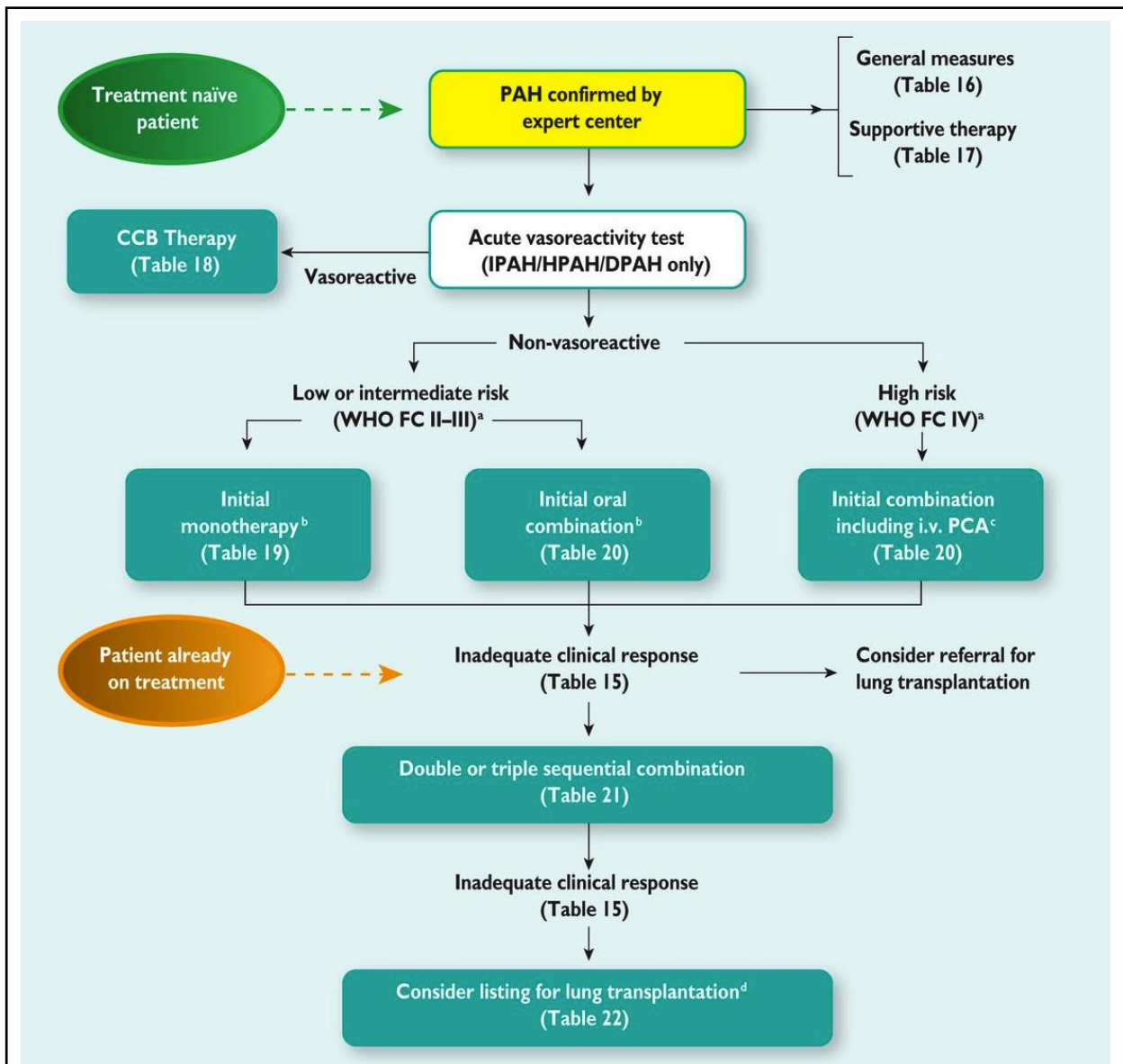


Figure 10 : Algorithme du traitement de l'HTAP

D'après (17)

CCB: calcium channel blockers: bloqueur de canaux calciques; DPAH: drug-induced PAH: HTAP induite par des drogues; HPAH: heritable PAH: HTAP familiale; IPAH: idiopathic PAH: HTAPi; i.v.: intravenous: intraveineuse; PAH: pulmonary arterial hypertension: HTAP; PCA: prostacyclin analogues: analogue des prostacyclines; WHO-FC: "World Health Organization functional class". ^a WHO-FC III patients considérés à haut risque. ^b Combinaison initiale combinaison d'ambrisentan et de tadalafil a été prouvée comme étant plus efficace qu'une monothérapie initiale de chacune des molécules permettant d'éviter la progression des symptômes. ^c L'époprosténol en intraveineux devrait être choisi en priorité car il réduit le taux de survie à 3 mois chez les patients « à haut risque » même en monothérapie. ^d Le ballon d'atrioseptostomie est aussi à considérer.

3.1.2. Traitements médicamenteux non spécifiques

3.1.2.1. Traitement anticoagulant

Les anticoagulants peuvent être utilisés dans les HTP de groupe 1 et 4 (68). Dans ces 2 groupes, des anomalies de la coagulation et de la fibrinolyse ont pu être observées. De plus, les patients atteints d'HTP ont un débit cardiaque diminué et une forte tendance à la sédentarité. Il est donc nécessaire de mettre en place un traitement anticoagulant. Ces anticoagulants sont d'autant plus nécessaires que les patients sont traités pendant de longues périodes par voie intraveineuse, car les risques de thrombose sont augmentés par l'utilisation d'un cathéter.

La contre-indication des anticoagulants est l'HTAP associée à une hypertension portale : il existe alors en effet un risque hémorragique lié à une éventuelle rupture des varices œsophagiennes (105).

Les traitements par antivitamines K sont très utilisés dans cette indication. Il est nécessaire de suivre par prise de sang les INR (International Normalized Ratio), qui doivent être compris entre 1,5 et 2,5 (d'après les recommandations de la HAS).

3.1.2.2. Traitement diurétique

Son utilisation est associée à un régime sans sel. Il permet de diminuer les signes de surcharge ventriculaire droite et d'améliorer les symptômes de la maladie.

La posologie doit être adaptée à chaque patient. Un ionogramme sanguin doit être effectué régulièrement pour évaluer la natrémie, la kaliémie et la créatininémie (représentant la fonction rénale) (d'après les recommandations de la HAS).

3.1.2.3. Digitaliques

Les digitaliques peuvent être prescrits en cas de fibrillation auriculaire permanente ou paroxystique. Ils permettent d'améliorer la fonction cardiaque (105). Toutefois, leur

utilisation doit être prudente, plus particulièrement dans les formes sévères d'HTAP ou en cas d'altération de la fonction rénale.

3.1.3. Traitements médicamenteux spécifiques

Avant la mise en place du traitement pharmacologique, il est nécessaire de tester la vasoréactivité des patients atteints d'HTP lors du premier cathétérisme cardiaque droit. Il s'agit de tester la PAPm avant et après l'administration de monoxyde d'azote (NO) inhalé (mélange air +/- NO à la concentration de 10 ppm, pendant 10 min). Les patients sont dits « répondeurs » lorsqu'une baisse de la PAPm d'au moins 10 mmHg est observée, pour atteindre une PAPm observée inférieure à 40 mmHg. Ce test permet de prédire la réponse des patients aux inhibiteurs calciques (68).

3.1.3.1. Inhibiteurs d'influx calcique

Lorsque les patients sont « répondeurs » au test de vasodilatation par NO inhalé, on peut traiter les HTP par des inhibiteurs de l'influx calcique. Ces molécules pouvant être utilisées à forte dose sont le diltiazem, la nifédipine et l'amlodipine (d'après les recommandations de la HAS). Ils ont une action vasodilatatrice mais pas d'action sur le remodelage vasculaire.

Les inhibiteurs d'influx calcique permettent une diminution de la PAPm et des résistances vasculaires pulmonaires. Les patients répondeurs représentent moins de 10 % des HTAP idiopathiques (70).

Si les patients sont non-répondeurs au test du NO, il existe des alternatives thérapeutiques.

En effet, il existe 3 grandes voies privilégiées à cibler dans l'HTAP qui sont : la voie de la prostacycline, la voie du NO et la voie de l'endothéline ; Figure 11. Ces traitements peuvent aussi être utilisés dans le cadre d'une association avec des inhibiteurs d'influx calcique.

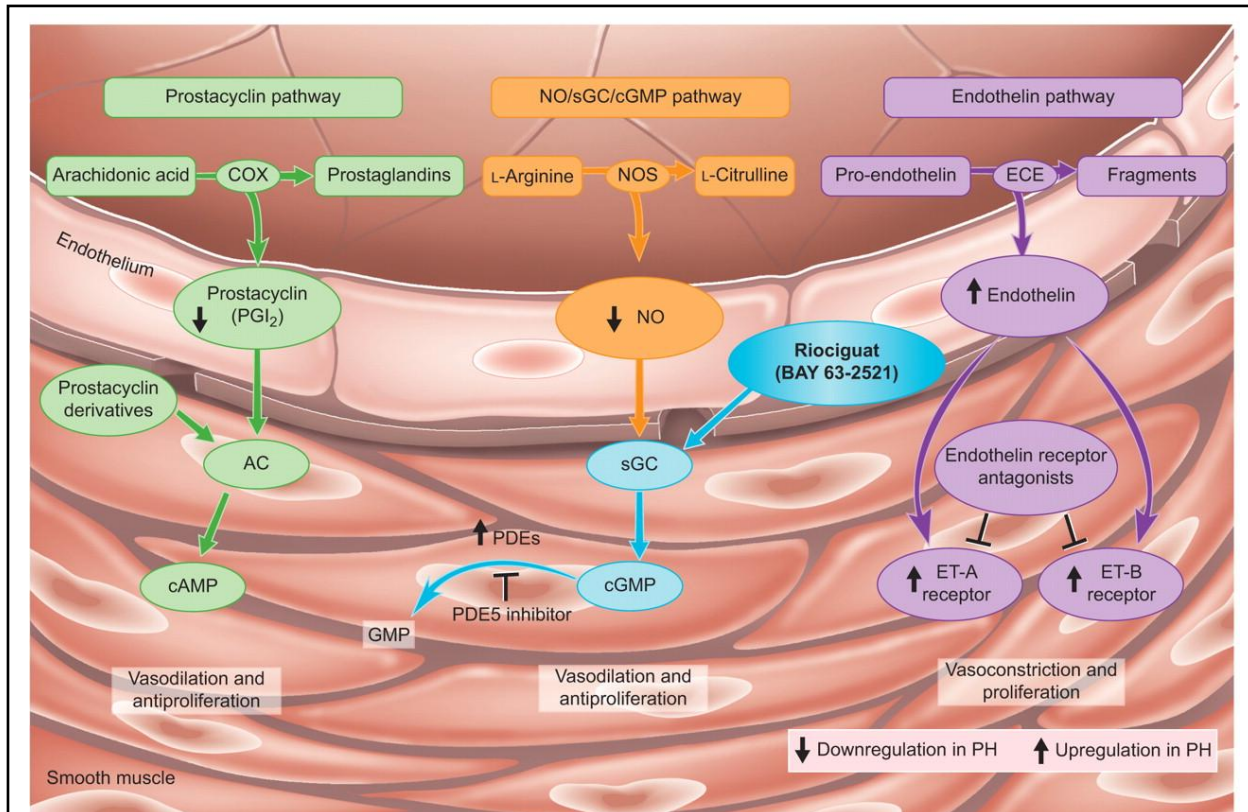


Figure 11 : Trois cibles privilégiées dans le traitement de l'HTAP = la prostacycline, la voie du NO et l'endothéline

D'après (106)

AC: adenylate cyclase; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; COX: cyclo-oxygenase; ECE: endothelin converting enzyme; ET: endothelin; GMP: guanosine monophosphate; NOS: NO synthase; PDE: phosphodiesterase; PH: pulmonary hypertension

3.1.3.2. La voie de la prostacycline

La prostacycline est principalement produite au niveau des cellules endothéliales. Elle entraîne une vasodilatation et une inhibition de l'agrégation plaquettaire. De plus, elle a une action anti-proliférative (107).

Dans l'HTAP, une dérégulation du métabolisme de la prostacycline a été mise en évidence. L'expression de la prostacycline synthase au niveau des artères pulmonaires, de même que les concentrations en métabolites de la prostacycline dans l'urine sont diminuées (108).

La voie de la prostacycline peut être ciblée par activation du récepteur IP de la prostacycline par 2 types de molécules (68) :

- Les analogues de la prostacycline (prostanoides), tels que le beraprost, l'époprosténol (Flolan[®]), l'iloprost, le treprostinil, sont très souvent utilisés.

L'époprosténol I.V. (intra-veineux) est indiqué en 1^{ère} intention dans les classes fonctionnelles 3 et 4 de l'HTP, soit les HTP les plus graves. Sa demi-vie est très courte (3 à 5 minutes), il a pu bénéficier d'une formulation thermostable. L'époprosténol a pu montrer son efficacité sur le plan hémodynamique, sur les capacités physiques et il est le seul traitement pharmacologique capable de diminuer la mortalité dans l'HTAP.

- Agonistes du récepteur IP de la prostacycline, comme le selexipag.

Il peut être administré par voie orale. Le mode d'action du selexipag et de ses métabolites est similaire à celui de la prostacycline endogène : c'est un agoniste du récepteur IP pour lequel il a une très grande affinité. Il diffère de la prostacycline du point de vue chimique (68). Lors d'essais cliniques, une diminution de la résistance artérielle pulmonaire a pu être mise en évidence (109). Des demandes d'autorisation de mises sur le marché sont en cours.

3.1.3.3. La voie du NO

Des anomalies de la synthèse du NO par les cellules endothéliales ont été observées à de multiples reprises dans l'HTP. Il a été aussi observé des anomalies dans sa signalisation, au niveau de la guanylate cyclase soluble (sGC) et de la guanosine mono-phosphate cyclique (GMPc) (68). Cette voie est d'autant plus intéressante que la voie du NO joue un rôle important chez les sujets sains dans le maintien du bon rapport ventilation sur perfusion. Ainsi dans les régions pulmonaires moins bien ventilées, il y a une diminution du NO et donc une vasoconstriction. Dans les régions mieux ventilées, l'expression du NO est plus élevée, permettant une vasodilatation et une augmentation du débit sanguin dans ces zones. Ainsi les molécules pharmacologiques impliquées dans la voie du NO entraînent préférentiellement une vasodilatation dans les zones les mieux ventilées du poumon (106).

Il en existe 2 types :

- Les inhibiteurs de la PDE-5 (phosphodiesterase-5), comme le sildenafil, le tadalafil, ou le vardenafil.

Ils agissent en inhibant l'action de la PDE-5 qui a pour action de cliver le GMPc en GMP inactif. Ce GMPc a une action anti-proliférative et vasodilatatrice.

- Les stimulateurs directs de la guanylate cyclase soluble (sGC) comme le riociguat.

Cette molécule a 2 effets sur la voie du NO :

- Elle augmente la sensibilité de la sGC au NO endogène (en stabilisant la liaison sGC-NO)
- Elle mime les effets du NO sur la sGC quand le NO est absent ou rare, par un site de liaison différent, indépendant du NO (51, 68, 106, 110).

Le riociguat est indiqué dans le traitement de l'HTAP, mais aussi pour les HTP du groupe 4 qui ne peuvent être thromboendartériectomisées (ou en association avec la thromboendartériectomie).

3.1.3.4. Antagonistes des récepteurs de l'endothéline

L'activation accrue de la voie de l'endothéline (locale et systémique) a été démontrée chez les patients atteints d'HTP. L'endothéline agit comme un vasoconstricteur et comme un agent mitogène au niveau des CML, par les récepteurs de l'endothéline –A et –B. Par contre, dans les cellules endothéliales, où seul le récepteur –B est présent, son activation conduit à la libération de molécules vasodilatatrices et antiprolifératives comme le NO et la prostacycline, qui peuvent contrebalancer les effets délétères de l'endothéline. Malgré ces différences observées dans les effets de ces récepteurs, les effets des antagonistes sélectifs-B ou non sélectifs –A et –B sont comparables.

Ces antagonistes sont : l'ambrisentan (sélectif du récepteur-A), le bosentan et le macitentan (-A et –B).

Le macitentan est une modification du bosentan, possédant une grande lipophilie (19). Cette modification permet une meilleure pénétration dans les tissus, augmente ses capacités de liaison à son récepteur, et augmente son efficacité et sa sûreté. Lors de l'étude SERAPHIN (Study with an Endothelin Receptor Antagonist in PAH to Improve Clinical Outcome), une étude traitement versus placebo, il a pu être montré que le macitentan augmentait la capacité à

l'effort, et diminuait la morbidité ainsi que la mortalité (111). Il est indiqué en 1^{ère} intention dans les HTP de classe fonctionnelle 2.

3.1.3.5. Les combinaisons thérapeutiques

Des essais cliniques combinant différentes thérapeutiques ciblant l'HTAP ont vu le jour ces dernières années. Ces combinaisons thérapeutiques peuvent être mises en place de manière initiale (ou de front) dès le diagnostic (112), ou de manière séquentielle lorsque les objectifs thérapeutiques ne sont plus remplis par une monothérapie (113).

La trithérapie représente un espoir important. Elle consiste en la combinaison de traitements ciblant 3 voies différentes connues pour être impliquées dans l'HTAP. Le patient doit donc prendre 3 médicaments : un antagoniste de l'endothéline, un médicament ciblant la voie du NO et un troisième ciblant la prostacycline. Une étude française (rétrospective issue d'un registre prospectif) a associé lors d'une trithérapie la prise d'époprosténol I.V., de bosentan et de sildenafil. Une diminution de la PAPm, de la résistance artérielle pulmonaire, ainsi qu'une augmentation de la capacité physique (6MWT) et de la capacité cardiaque (index cardiaque) ont été observés. Pour la première fois, une diminution de la classe fonctionnelle de la NYHA a été notée, passant de 3-4 à 1-2. De plus, aucune mortalité n'a été observée pendant l'étude (114). Il s'agit donc d'une très grande avancée dans la prise en charge des patients atteints d'HTAP.

L'efficacité de ces traitements combinés est accrue. Actuellement, la question est de savoir s'il vaut mieux donner séquentiellement les combinaisons thérapeutiques ou de manière initiale. La question est d'autant plus présente que ces traitements sont très coûteux, qu'ils peuvent avoir des effets indésirables non négligeables et que le risque d'interactions médicamenteuses est multiplié. Par exemple, le bosentan est un inducteur enzymatique des cytochromes-P450 (CYP450) 3A4 et 2C9 (115). Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune étude comparant les combinaisons thérapeutiques séquentielles versus initiales (17).

De surcroît, une méta-analyse ayant pour but de comparer l'utilisation en monothérapie des traitements ciblant l'HTAP avec les thérapies combinées a permis de conclure à une meilleure efficacité de ces dernières. Les thérapies combinées permettent notamment de diminuer l'aggravation clinique des patients. En revanche, il existe encore une proportion de patients dont les symptômes continuent à progresser alors qu'ils reçoivent une

combinaison de traitements. Les auteurs de cette analyse concluent qu'il est donc nécessaire et urgent de rechercher de nouveaux traitements (116, 117).

3.1.4. Traitements non médicamenteux

3.1.4.1. Oxygénothérapie au long cours

L'oxygénothérapie est prescrite lorsque le patient développe une hypoxémie importante. Le but de cette oxygénothérapie est de maintenir la PaO₂ au-dessus de 8KPa (60 mmHg) (68).

3.1.4.2. Endartériectomie

Elle ne peut être réalisée que dans des centres spécialisés. Elle consiste en une procédure chirurgicale ayant pour but d'enlever le thrombus formé dans les artères proximales. Ce traitement, disponible uniquement pour le groupe 4 des HTP, est un traitement curatif.

3.1.4.3. L'atrioseptostomie

Il s'agit de réaliser une ouverture dans le septum inter-auriculaire par voie endovasculaire de manière à faire diminuer les pressions cardiaques droites, et à améliorer le débit du cœur. Elle n'est réalisée que dans des centres spécialisés. Elle est utilisée dans les HTAP sévères en attente de transplantation cardio-pulmonaire.

3.1.4.4. Transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire

La transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire est le traitement curatif utilisé en dernier recours. Cette transplantation est pour le moment le seul traitement curatif de l'HTAP. Les transplantations bi-pulmonaires ou cardio-pulmonaires sont privilégiées.

L'indication pour une transplantation est décidée par le centre de référence national et/ou par son réseau de correspondants en province (d'après les recommandations de la HAS).

3.1.5. Prévention des complications et éducation thérapeutique

Il est important de prendre en compte la dimension psychologique lors de l'annonce de la maladie, en prenant du temps pour que le patient prenne connaissance de sa maladie. Il peut en résulter pour le patient d'importantes modifications de son rythme de vie. Il faut pouvoir apporter un support psycho-social, pour lequel il existe aussi des associations de patients (68).

L'éducation thérapeutique des patients est capitale pour la bonne observance des traitements, et en particulier pour tous les traitements nécessitant des injections. Il faut mentionner les règles d'hygiène pour les patients possédant un cathéter tunnelisé pour leurs injections d'époprosténol. Les infections cutanées sont un point à aborder pour les patients traités par tréprostinil.

La prévention des infections virales est assurée, pour ces patients fragilisés par la maladie, par la vaccination des patients : antigrippale et antipneumococcique (d'après les recommandations de la HAS).

La grossesse reste associée à un fort taux de mortalité chez les patientes atteintes d'HTAP. Cependant, une étude utilisant des inhibiteurs d'influx calcique semble montrer une diminution des risques grâce à ce traitement (68).

Les exercices physiques ne doivent pas être exténuants, ni extrêmes. Ils sont limités à l'apparition des symptômes, et il est recommandé de les effectuer dans des centres expérimentés dans la réhabilitation et le traitement des HTAP (68). Il est aussi recommandé d'éviter les situations à risques pour la maladie telles que des séjours en haute altitude, ou des anesthésies générales par exemple.

Malgré de grands progrès thérapeutiques ces dernières années, il n'y a pas encore de traitements curatifs dans l'HTP. Les patients continuent à avoir un pronostic de survie faible (30), en grande partie à cause d'un diagnostic tardif. Deux grands axes d'amélioration de la prise en charge des patients atteints d'HTP peuvent ainsi être étudiés. Le premier serait de trouver de nouvelles techniques de diagnostic moins invasives, permettant une prise en charge de chaque type d'HTP de manière efficace et le second serait de rechercher de nouvelles cibles afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

3.2. Difficultés de diagnostiquer de manière spécifique chaque type d'HTP

3.2.1. Difficultés actuelles de caractérisation des différents types d'HTP

Le diagnostic de l'HTP est difficile car les points d'appels cliniques sont tardifs et peu spécifiques. De plus, il est important de bien différencier les différents types d'HTP, car la prise en charge est très différente selon leur classification. L'intervention de tous les professionnels capables de pouvoir améliorer le diagnostic et la prise en charge de l'HTP est ainsi possible au sein de réunions de concertation pluridisciplinaire, ou RCP, qui ont lieu dans des centres de référence pour l'HTP. Ces centres de référence possèdent donc une compétence et une expérience spécifique à cette maladie. Ces compétences sont essentielles car l'HTP, qui est une maladie rare et complexe, nécessite un diagnostic fin. En effet, il ne s'agit pas seulement de diagnostiquer une éventuelle HTP, mais aussi d'en comprendre la ou les cause(s), savoir leur attribuer une classification précise, et pouvoir prendre en charge de manière spécifique chaque patient.

La principale cause d'HTP devrait être identifiée en utilisant la classification et l'algorithme de diagnostic (11) ; Figure 10 ; Tableau 3. Ce diagnostic nécessite une démarche multidisciplinaire, regroupant au cours des RCP au minimum des experts dans le domaine de la cardiologie, de la pneumologie et de l'imagerie médicale. Cette démarche multidisciplinaire est encore plus importante pour les patients dont l'HTP a plus d'une cause (17, 118). Il est alors nécessaire de prendre en considération chacune des causes possibles pour la prendre en charge. Le diagnostic de causes multiples peut complexifier les éventuels traitements. Par exemple, une patiente atteinte de BPCO ayant une HTP peut aussi avoir consommé des anorexigènes. Il est alors nécessaire, lors de la RCP, de se questionner sur le bénéfice attendu quant à l'éventuelle utilisation de traitements ciblant les vaisseaux (17, 112, 119). Il est très important que le cas de ces patients, atteints de causes multiples d'HTP, soit étudié en RCP afin d'envisager leur inclusion dans des essais cliniques en cours. Pour ces patients atteints de causes multiples il pourrait être intéressant de créer de nouveaux essais cliniques.

La classification de l'HTP, basée sur des paramètres cliniques et hémodynamiques, est en perpétuelle modification. Ainsi, en 2015 lors de la réunion du groupe de travail conjoint des sociétés européennes de cardiologie et de pneumologie, cette classification a à nouveau été modifiée et étayée (17, 118). Mais cette classification pourrait encore évoluer si la notion de phénotype devait être prise en compte. En effet, la classification actuelle est basée sur des paramètres cliniques et hémodynamiques, et ne prend pas en compte la personnalisation des traitements pour chaque individu (120). Dans l'idée d'une application clinique, les phénotypes pourraient jouer un rôle complémentaire à la classification déjà existante. La caractérisation phénotypique est un concept plus avancé dans d'autres pathologies telles que la BPCO ou l'asthme (4, 121, 122). Des phénotypes d'HTP ont déjà été mis en évidence, tels que les HTP mixtes pré- et post-capillaires, la mauvaise adaptation par hypertrophie du VD, l'HTAP associée au VIH, l'HTP dans la population très âgée, l'HTP pédiatrique, ou encore les survivants au long terme par exemple. D'ailleurs, un phénotype d'HTP sévère associée à la BPCO est plus amplement décrit dans la partie classification (groupe 3) de cette thèse, et intéresse beaucoup la recherche actuelle (37, 120). Cette HTP sévère se développe selon un mécanisme méconnu qui pourrait résulter, d'après certains, d'une réponse exagérée à la maladie pulmonaire, et pour d'autres, d'une HTAP idiopathique concomitante (120), ou encore être liée à une toxicité spécifique du tabac (123). Ce phénotype présente un intérêt thérapeutique potentiel. En effet, dans l'HTP secondaire à une BPCO, il faut prendre en

charge la maladie pulmonaire. De plus, il n'est pas recommandé d'utiliser des traitements ciblant les vaisseaux, mais plutôt une oxygénothérapie. Par contre, dans l'HTP sévère secondaire à une BPCO, de nombreux essais cliniques sont en cours afin de cibler les vaisseaux. Les résultats de ces essais sont cependant préliminaires et restent à confirmer (37, 124, 125).

D'autre part, la technique diagnostique de référence, le cathétérisme cardiaque droit, présente des contre-indications et des effets indésirables qui limitent son utilisation. Ces contre-indications sont les suivantes : présence d'un stimulateur intracardiaque, troubles importants du rythme cardiaque, ou encore endocardites et présence d'une phlébite haute. Dans les cas où le cathétérisme apparaît tout à fait nécessaire, la décision finale sera prise après concertation. En ce qui concerne les incidents observables lors du cathétérisme cardiaque droit, il peut exister des accidents liés à la ponction (infectieux, hématome), liés à au passage de la sonde tels que troubles du rythme (tachycardie, fibrillation auriculaire), ou crise d'hypertension, liés au test de vasoréactivité (hypotension systémique, bronchospasme si inhalation de prostanoloïde) et, de manière très rare, une perforation de l'artère pulmonaire avec constitution d'un pneumothorax peut être observée (126).

Pour mieux comprendre certains mécanismes physiopathologiques, il semble primordial de développer de nouvelles techniques d'observation et/ou de diagnostic. Ces techniques doivent être non invasives afin de procurer un avantage vis-a-vis de la technique de référence, le cathétérisme cardiaque droit, pouvant entraîner des accidents. Il est donc très important de favoriser la recherche de techniques de diagnostic moins invasives. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles techniques de détection non invasives de l'HTP est très active.

Certaines techniques semblent très prometteuses, par exemple la technique de détection des composés organiques volatiles. Ces derniers sont des composés organiques détectés à partir de l'air expiré qui ont une pression de vapeur élevée. Ces composés pourraient constituer une empreinte du souffle des patients atteints d'HTP et permettre ainsi de les différencier des sujets sains (127).

L'imagerie médicale, et plus particulièrement la tomographie par ordinateur, semblent également offrir de nouvelles perspectives intéressantes.

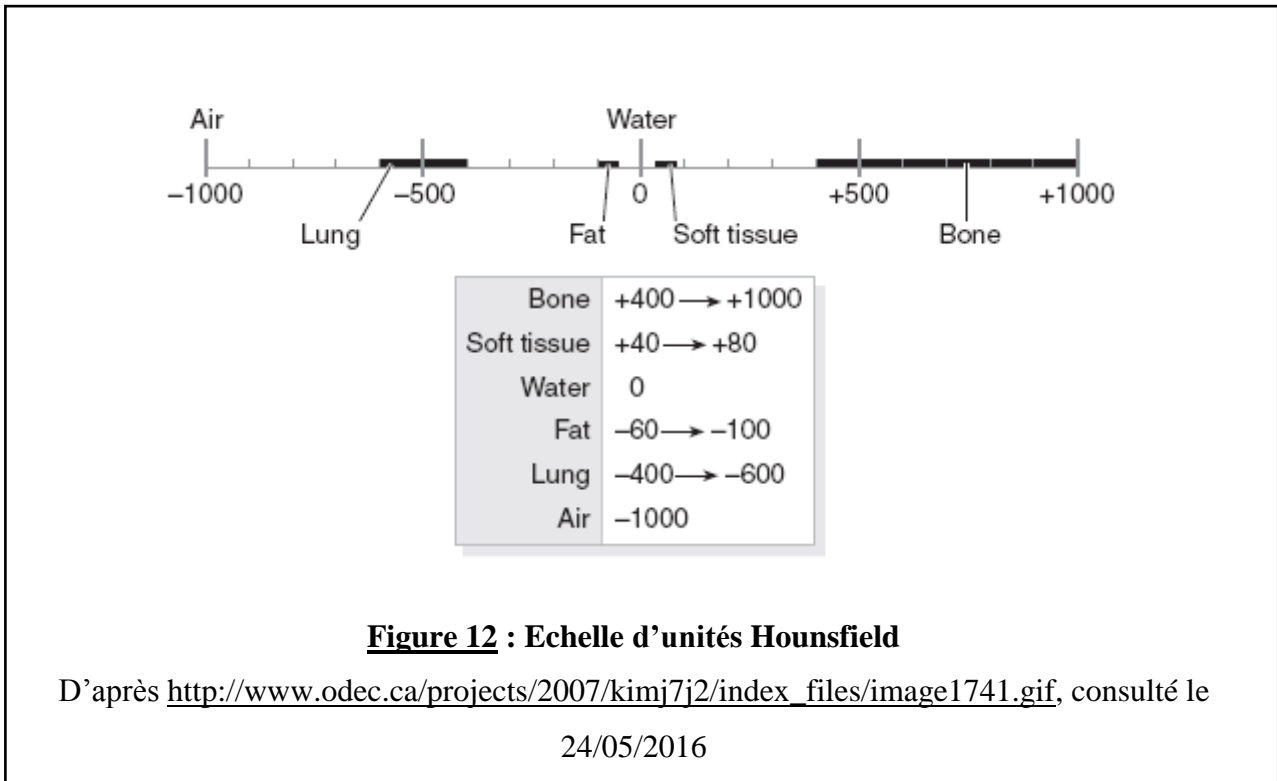
3.2.2. Apport de l'imagerie thoracique

3.2.2.1. La radiographie

La radiographie utilise les rayons X qui traversent le corps humain en étant plus ou moins absorbés par les tissus en fonction de leur densité. Ces rayons X impriment un film photographique qui peut être remplacé par un détecteur électronique. Avec la radiographie, on peut observer d'éventuelles modifications parenchymateuses évocatrices de maladies respiratoires (recommandations de la HAS).

3.2.2.2. Le scanner thoracique (tomodensitométrie)

L'apport de l'informatique et du traitement numérisé des images a abouti à la mise au point de la tomodensitométrie (encore appelée scanner). Cette technique repose également sur l'utilisation des rayons X, mais permet d'obtenir des images tridimensionnelles des organes ou des tissus (os, muscles ou vaisseaux) sous forme de coupes. En pratique, un tube émetteur de rayons X tourne à très grande vitesse autour du patient et prend une succession d'images du corps à 360°. Des capteurs qui entourent le patient mesurent l'absorption des différents tissus. L'image radiographique résulte de la différence d'atténuation des rayons X dans les différents milieux traversés. Les coefficients d'atténuation doivent être rapportés au coefficient d'atténuation de référence qui est celui de l'eau. Les valeurs ainsi rapportées sont exprimées en unité Hounsfield (UH). Les unités Hounsfield s'échelonnent entre -1000 et +1000 pouvant ainsi imager, respectivement, l'air et les os ; Figure 12. Grâce à la tomodensitométrie, on visualise les volumes et les structures. Comme pour la radiographie, un produit de contraste à base d'iode, opaque aux rayons X, peut être nécessaire pour étudier certains organes.



Avec le scanner, il est possible d'observer certains signes de modification vasculaire pouvant orienter vers un diagnostic d'HTP tels qu'un élargissement du tronc de l'artère pulmonaire en regard de l'aorte (128, 129) ; Figure 13, ou des reflux de produit de contraste iodé dans la veine hépatique et dans la veine cave inférieure (129).

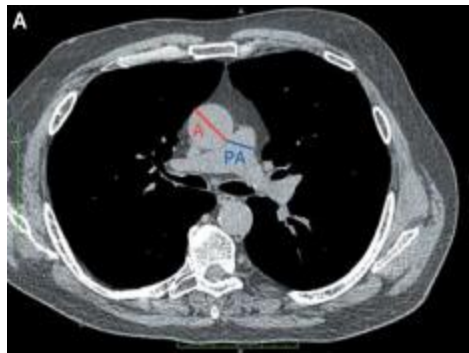


Figure 13 : Obtention par tomodensitométrie du ratio de diamètre de l'artère pulmonaire sur l'aorte

D'après (128)

Obtention par la mesure du diamètre de l'artère pulmonaire (bleu) et du diamètre transverse de l'aorte (rouge) sur une coupe axiale de thorax par tomodensitométrie.

De plus, la tomodensitométrie peut être utile dans le diagnostic différentiel car elle pourrait permettre de mieux caractériser différentes formes d'HTP. Par exemple, cette technique permet d'observer un rétrécissement disharmonieux du calibre des vaisseaux périphériques, signe plus spécifique de l'HTAP par rapport à d'autres formes d'HTP.

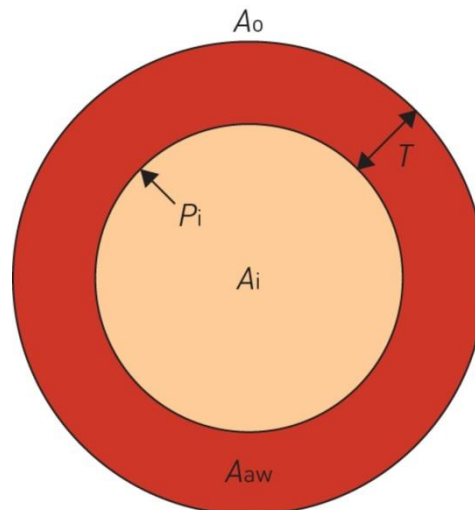
La tomodensitométrie permet aussi, après injection d'un produit de contraste, la recherche d'HTP thromboembolique (HTP post-embolique = CTEPH) et de préciser la localisation de l'éventuel thrombus : atteintes proximales, déficit de perfusion excentré ou encore aspect en « mosaïque » (18). Cet aspect en mosaïque peut également être observé dans les autres formes d'HTP à un stade avancé. La localisation du thrombus est très importante, car un thrombus localisé de manière proximale pourra bénéficier d'un traitement chirurgical (endartériectomie). Des signes indirects d'embolie pulmonaire peuvent être décelés, comme des parois artérielles irrégulièrement épaissies, un rétrécissement abrupt du diamètre d'une artère ou encore l'amputation d'une ou de plusieurs branches d'artères lobaires ou segmentaires. Pour la CTEPH, la tomodensitométrie est une technique réalisée en deuxième intention afin de confirmer le diagnostic ; l'examen de référence est la scintigraphie pulmonaire de perfusion et de ventilation (19). Cette technique peut aussi permettre de diagnostiquer un shunt vrai si on observe un passage extra-pulmonaire du marqueur.

La tomodensitométrie permet de montrer des modifications parenchymateuses et médiastinales de l'HTP (129), et pourrait donc également apporter des informations concernant les HTP des groupes 1' et 2. En effet, une étude récente a montré que dans les HTP « veineuses » (groupe 2), la densité moyenne du poumon était corrélée à la PCWP (130). Ce biomarqueur, acquis de manière semi-automatique, pourrait donc être utile au diagnostic différentiel du groupe 2 des HTP. De plus, il est possible de différencier le groupe 1' parmi les HTP par tomodensitométrie thoracique en observant des opacités en verre dépoli centrolobulaires, des lignes septales, et des adénopathies médiastinales (32).

D'autre part, des anomalies du cœur droit peuvent aussi être observées, par exemple une dilatation et/ou une hypertrophie du VD, une dilatation de l'oreillette droite, ou une incurvation du septum interventriculaire (129).

La tomodensitométrie permet également de mieux observer des structures plus petites, comme par exemple les petites artères. Un travail avait étudié l'HTP modérée dans une population de patients atteints de BPCO avec un emphysème sévère, et avait pu montrer que la surface des petits vaisseaux pulmonaires était corrélée négativement avec la PAPm et permettait d'estimer le degré d'HTP (42). Nous avons pu utiliser cette technique afin d'évaluer l'altération des petits vaisseaux pulmonaire dans une population de BPCO avec une HTP sévère (131).

Enfin, la tomodensitométrie est d'autant plus intéressante que c'est une technique déjà utilisée dans le diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies pulmonaires pouvant causer l'HTP. Des paramètres, déterminés à partir de cette technique, permettent d'observer et de quantifier par exemple l'emphysème ou le remodelage bronchique, et sont déjà utilisés pour étudier les maladies pulmonaires (47, 132-135). Par exemple, dans la BPCO il est possible d'évaluer un paramètre nommé « %WA » (« percentage wall area ») qui correspond à l'évaluation de l'épaisseur de la paroi bronchique (136) ; Figure 14. Ainsi, un emphysème élevé ou un rétrécissement des voies respiratoires peuvent être corrélés avec une aggravation des fonctions respiratoires dans la BPCO (47, 132). Ces paramètres d'études nous ont permis d'étudier les anomalies parenchymateuses et bronchiques dans une population de BPCO avec ou sans HTP (137). Le développement du diagnostic de l'HTP par tomodensitométrie dans ces maladies pulmonaires est donc un enjeu intéressant, car il pourrait avantageusement remplacer le cathétérisme cardiaque droit, sans ajouter d'examen supplémentaire.



$$\%WA = \frac{A_{aw}}{A_o} \times 100$$

Figure 14 : Mesures de l'épaisseur bronchique normalisée

D'après (136)

Dimensions des voies respiratoires : A_{aw} : aires de la paroi des voies respiratoires, T : épaisseur de la paroi, A_o : aire de la totalité des voies respiratoires, A_i : aire interne, P_i : périmètre interne, $\%WA$: pourcentage de l'épaisseur bronchique.

3.2.2.3. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

En comparaison à la tomodensitométrie, plus utilisée pour observer les structures, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est également utilisée dans l'HTP, mais davantage pour les fonctions.

L'IRM consiste à réaliser des images du corps en le plaçant dans un champ magnétique (généralisé à l'aide d'un gros aimant) où il est soumis à des ondes de radiofréquence. Selon cette technique, les atomes d'hydrogène de la matière vivante placés dans un champ magnétique intense s'orientent tous dans la même direction ; ensuite ces atomes sont mis en résonance un court instant grâce à une onde radio. A l'arrêt de la stimulation, les atomes réémettent l'énergie accumulée en produisant un signal qui est enregistré par un système informatique. Puis l'ordinateur restitue ces signaux sous forme d'images.

L'IRM permet d'observer les volumes, les formes ainsi que les débits. Dans l'HTP, la pression dans le VD conduit à une incurvation vers la gauche de la ligne septale ventriculaire

et à une diminution de la sortie de sang du VD. En diminuant le flux sanguin, le remplissage du ventricule gauche est réduit, ce qui contribue à la diminution du volume ventriculaire gauche et de sa capacité à assurer les débits (138).

Il a pu être mis en évidence que le volume d'éjection, pompé dans l'artère pulmonaire, peut être pris dans un vortex si la PAPm est élevée. Il existerait alors une corrélation entre la PAPm et le temps de présence de ce vortex dans le tronc de l'artère pulmonaire (139).

L'IRM a permis de mettre en évidence l'apparition d'une rigidité diastolique du VD chez les patients atteints d'HTP en comparaison aux patients contrôles. Cette augmentation de rigidité peut s'expliquer à la fois par une augmentation du taux de collagène et par une rigidité intrinsèque des sarcomères des cardiomyocytes du VD (140).

Plus récemment, l'IRM a pu montrer que la fraction d'éjection de l'oreillette droite était capable de prédire la mortalité dans l'HTP. Plus précisément, une diminution de la fraction d'éjection de l'oreillette droite par IRM est indépendamment associée avec une moins bonne survie, après ajustement avec les autres facteurs de risque (141).

La prise en charge thérapeutique des patients souffrant d'HTP est à l'heure actuelle encore très complexe, du fait des multiples formes d'HTP, compliquées par la présence de plusieurs phénotypes au sein de ces différentes formes. De plus, comme présenté précédemment, les traitements actuellement sur le marché, en particulier les traitements spécifiques de l'HTAP, basés sur des mécanismes essentiellement vasodilatateurs, offrent principalement des effets purement symptomatiques. La recherche doit donc continuer afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Il est difficile d'effectuer ces recherches sur des échantillons d'origine humaine. Cela s'explique notamment par deux raisons principales, à savoir le faible nombre de patients atteints d'HTP, et la contre-indication que représente la biopsie pulmonaire chez les patients souffrants d'HTP, qui risquent, entre autres, des hémorragies massives. Ainsi l'expérimentation animale a toute sa place dans cette recherche, avec le développement de modèles animaux pertinents, mimant le plus possible les différents aspects physiopathologiques de la maladie humaine, et permettant l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques.

3.3. Modèles expérimentaux d'HTP chez le rat

L'utilisation de modèles animaux dans l'HTP est nécessaire du fait de la difficulté d'obtenir des échantillons d'origine humaine.

De nombreux modèles animaux ont déjà été développés afin de caractériser les mécanismes physiopathologiques de l'HTP. Ces modèles ont aussi comme utilité de pouvoir évaluer *in vivo* de nouveaux traitements pharmacologiques.

Ces modèles animaux sont pertinents lorsqu'ils miment et reproduisent au maximum l'ensemble des caractéristiques physiopathologiques de l'HTP humaine. Ci-dessous sont présentés les principaux modèles expérimentaux d'HTP développés chez le rat.

3.3.1. Modèles classiques

Il existe deux modèles dits « classiques » d'HTP : le modèle monocrotaline (MCT), consistant en l'injection de MCT chez le rat, et le modèle hypoxique (placement des animaux en hypoxie chronique).

3.3.1.1. Monocrotaline (MCT)

La MCT est un alcaloïde pyrrolizidinique toxique extrait d'une plante : *Crotalaria spectabilis*, de la famille des *Fabaceae*. Cette molécule n'est active dans le corps qu'après biotransformation hépatique (oxydation) par les cytochromes P-450 pour donner le composé actif : la dihydromonocrotaline. Cette substance possède une forte toxicité endothéliale, dont le mécanisme exact n'est pas connu, causant des altérations et des lésions de l'endothélium. Ces lésions de l'endothélium peuvent ensuite entraîner le développement d'une HTAP chez l'animal. La MCT peut être administrée par voie sous-cutanée ou par voie intra-péritonéale (142).

Ce modèle est particulièrement intéressant car il présente une forte composante inflammatoire. Le temps nécessaire à l'animal pour développer les premiers symptômes est généralement de 2 semaines. Les premières altérations décrites se situent au niveau

endothélial et sont observées, tout comme l'hypertrophie du ventricule droit, dès 14 jours (143). Entre 1 à 2 semaines, des modifications hémodynamiques peuvent aussi être enregistrées, avec une augmentation de la PAPm, accompagnée d'un remodelage artériel pulmonaire (144). La sévérité de ce modèle pourrait aussi s'expliquer par une infiltration précoce de cellules mononucléées inflammatoires au niveau des artères, ou encore par l'infiltration de macrophages.

La monocrotaline a pour inconvénients de ne pas seulement toucher les vaisseaux pulmonaires, elle a aussi une toxicité vasculaire systémique ; elle nécessite une biotransformation hépatique associée avec d'éventuelles variations interindividuelles. Cette métabolisation a lieu au niveau hépatique et fait intervenir les cytochromes P-450 qui ont une activité pouvant varier d'un individu à un autre. La toxicité de la MCT touche aussi le cœur, ce qui rend plus difficile l'appréciation du remodelage cardiaque. De plus, la MCT est un modèle pour lequel les traitements testés au préalable *in vitro* sont souvent efficaces, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme. Cet aspect de ce modèle ne reproduit donc pas parfaitement l'HTAP (142, 145).

3.3.1.2. Hypoxie chronique (Hx)

Le modèle d'hypoxie chronique (Hx) permet aux animaux de développer une HTP en 3 semaines. Des caissons normo- ou hypobariques sont les plus souvent utilisés. Ce modèle a pour avantage d'être très reproductible au sein d'une même espèce de rats. Dans ce modèle, la pathologie s'aggrave progressivement, le premier symptôme qui apparaît dès la première semaine étant la muscularisation des petites artères qui ne le sont pas physiologiquement (142). L'inflammation, bien que moins marquée que dans le modèle MCT, est là aussi présente. L'expression augmentée de certaines chimiokines et de leurs récepteurs précède l'infiltrat inflammatoire. Au bout de 2 semaines, on observe déjà une augmentation de la PAPm et une hypertrophie cardiaque droite.

Dans ce modèle, comme dans celui de la MCT, la réponse au facteur déclencheur de la maladie est corrélée à l'âge de l'animal : les animaux plus jeunes sont plus sensibles. Il est donc important, lors d'un protocole expérimental, de toujours utiliser des animaux du même âge.

Ce modèle peut être utilisé pour étudier les HTP modérées, plus précisément les HTP du groupe 3, liées à des anomalies pulmonaires telles que la BPCO, ou associées à des séjours en très haute altitude.

Ces modèles classiques sont très intéressants et ont été bien décrits dans la littérature (142). Toutefois ils ne permettent pas d'observer certains aspects de la pathologie humaine. En effet, ces modèles ne permettent pas de voir certaines lésions histopathologiques caractéristiques de l'HTP sévère, telles que des lésions plexiformes.

3.3.2. Modèles sévères d'HTAP

Les modèles sévères correspondent généralement à la combinaison de plusieurs méthodes afin de reproduire chez l'animal un phénotype plus sévère et plus proche de l'humain et plus sévère. La sévérité de ces modèles est très intéressante, car il est connu que, dans un contexte clinique, l'HTAP est diagnostiquée dans les phases sévères et tardives de la maladie (146).

3.3.2.1. Sugén

Le modèle Sugén associe l'injection de SU5416 (20 mg/kg) (un inhibiteur de la kinase du récepteur du « vascular endothelial growth factor-2 » : VEGF-2), le placement en hypoxie chronique pendant 3 semaines des rats, puis un retour en air ambiant pendant 10 à 11 semaines (92, 147). Ce modèle nécessite ainsi 13 à 14 semaines, ce qui est relativement long et représente une limite du modèle.

Dans ce modèle, on observe différentes caractéristiques de l'HTAP sévère. D'abord, on peut observer sur le plan hémodynamique une élévation de la PAPm et une diminution de l'index cardiaque (148) ; on observe aussi une hypertrophie cardiaque et de la fibrose cardiaque (149). Ce modèle permet également d'observer des altérations mimant l'HTAP sévère humaine. Plus précisément, il permet l'étude de nombreuses lésions artérielles pulmonaires telles que les lésions plexiformes « aneurysm-like » ou « stalk-like », des lésions

de fibrose concentrique laminaire, ou non laminaire, ou des lésions excentriques (92) ; Figure 15.

De plus, ce modèle semble refléter la résistance aux traitements observée dans l'HTAP humaine (146, 150), rendant ainsi ce modèle d'autant plus pertinent (146).

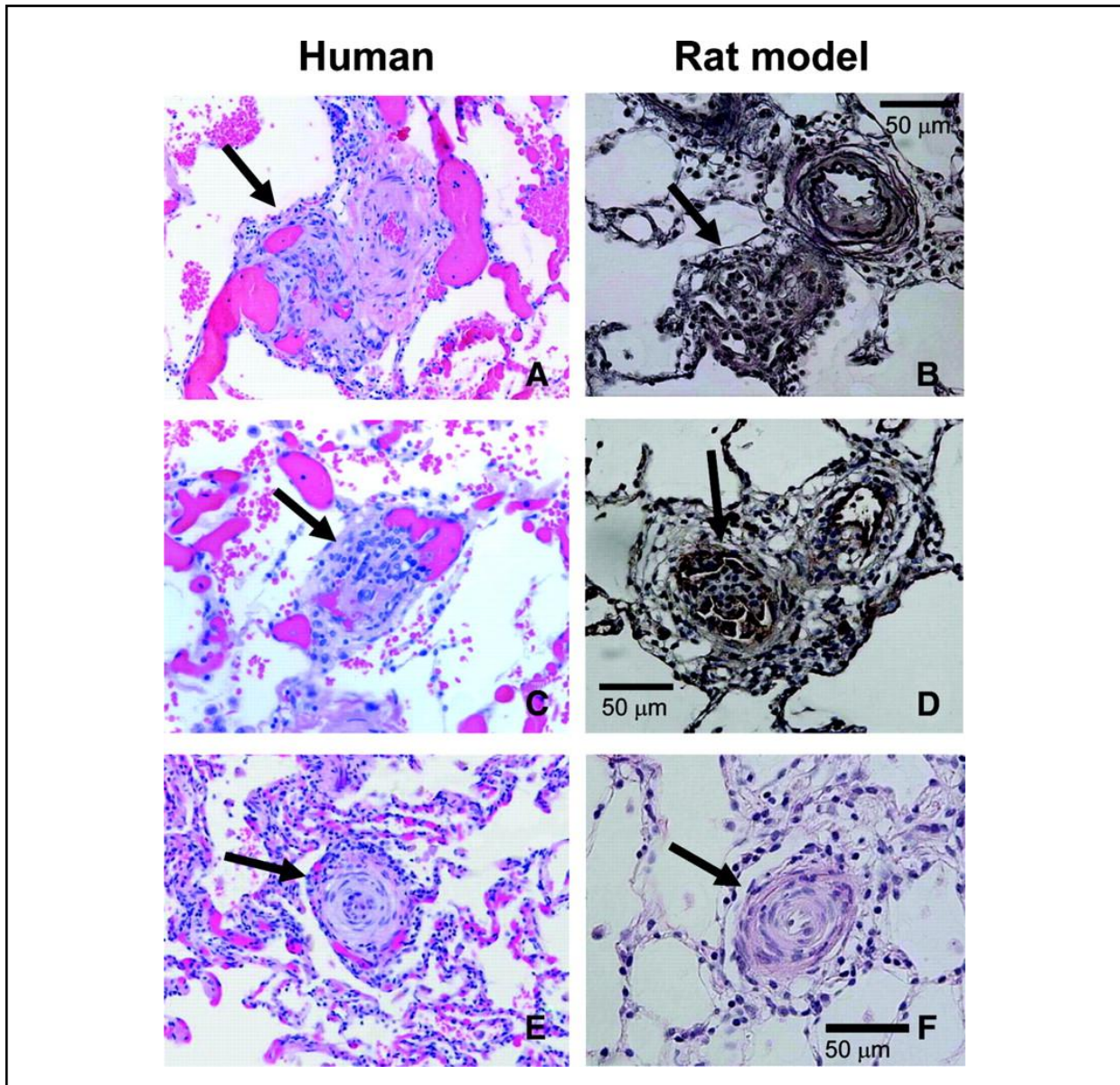


Figure 15 : Lésions similaires entre le modèle de rat “Sugen” et celles d’HTAP humaine

D’après (92)

A, C and E : photos de lésions humaines. B, D and F : photos de lésions vues chez le rat sugen. A, B = lésions plexiformes « cellulaires » de type aneurysm-like. C, D = vue transversale à l’axe de l’artère pulmonaire de lésions plexiformes avec une occlusion luminale. E, F = lésions de fibrose intimale concentrique laminaire « cellulaire ». A, C, E et F : coloration éosine-hématoxyline. B : coloration de van Gieson. D : immunomarquage du facteur de von Willebrand.

Ce modèle combinant l'injection de SU5416 et l'hypoxie chronique a aussi été étudié sur de plus courtes périodes. Une première étude a utilisé le SU5416 (20 mg/kg) associé à 3 semaines en caissons hypobare suivi de deux semaines en normoxie (5 semaines). Ce protocole a permis l'observation d'altérations hémodynamiques et physiopathologiques intéressantes, notamment des lésions d'occlusion, mais n'a pas conduit à l'apparition de lésions plexiformes (151). Une seconde étude, plus récente, a utilisé de fortes doses de SU5416 (200 mg/kg) combinées à 3 semaines d'hypoxie chronique, menant à des lésions d'occlusion et à des lésions plexiformes (77). Toutefois, ce modèle ne permet pas d'observer de lésions thrombotiques pourtant observable chez l'Homme.

3.3.2.2. Sugen et pneumonectomie

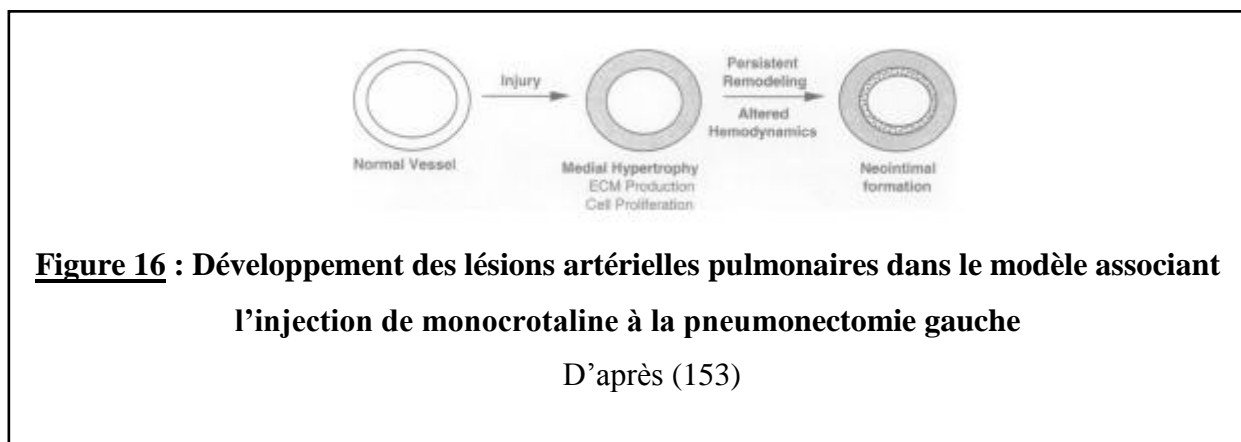
Une procédure chirurgicale (pneumonectomie gauche) suivie, deux jours plus tard, d'une injection de SU5416 (25 mg/kg) permet de créer un nouveau modèle. En enlevant le lobe du poumon gauche, tout le sang est redirigé vers les lobes du poumon droit restant, afin d'augmenter le flux sanguin dans ce dernier (152-154). La pneumonectomie non associée à l'injection de molécule n'entraîne pas de remodelage artériel pulmonaire (152). Cette procédure chirurgicale nécessite un opérateur entraîné, ce qui est une limite importante de ce modèle.

Cette combinaison de méthode a été analysée à 2 et à 6 semaines d'évolution. A 6 semaines, des altérations hémodynamiques par échocardiographie et par mesure de pression dans le ventricule droit ont pu être mis en évidence. Toutefois, aucune lésion plexiforme ou thrombotique n'a été observée (155).

3.3.2.3. Monocrotaline et pneumonectomie

Ce modèle requiert d'abord une injection de monocrotaline (60 mg/kg) suivie, une semaine plus tard, d'une procédure chirurgicale (pneumonectomie gauche).

Ce modèle combiné reproduit les altérations hémodynamiques définissant l'HTP avec l'augmentation de la PAPm, l'hypertrophie cardiaque et l'apparition de lésions néointimales au niveau des vaisseaux pulmonaires (153); Figure 16. D'après White *et al.*, une pneumonectomie sur de jeunes rats (200g) suivie d'une injection de monocrotaline une semaine plus tard, permettrait l'apparition de lésions plexiformes dès la première semaine après l'injection de MCT. Cependant, le temps d'apparition très court et l'aspect de ces lésions peuvent remettre en question la fiabilité de ce modèle pour reproduire les lésions humaines (156).



3.3.2.4. Modèle combinant une injection de monocrotaline et l'hypoxie chronique (MCT+Hx)

Ce modèle a été développé dans notre laboratoire (157). Il associe l'injection de monocrotaline (60 mg/kg, i.p.) avec le placement dans un environnement hypoxique et hypobarique (0,5 atm) des rats de souche Wistar pendant 3 semaines.

Dans un premier temps, la caractérisation de ce modèle a permis de mettre en évidence différents aspects physiopathologiques très intéressants de l'HTAP sévère : augmentation de la pression dans le ventricule droit, augmentation de l'hypertrophie cardiaque droite, augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires (macrophages essentiellement), un

remodelage vasculaire pulmonaire important : épaissement de la media, occlusion luminale, altération de l'endothélium. Un autre groupe a travaillé avec ce même modèle et a, lui aussi, observé une modification hémodynamique, une hypertrophie du ventricule droit et de la media vasculaire pulmonaire (158) ; Figure 17.

De plus, dans le premier travail réalisé au laboratoire, 4 rats supplémentaires avaient été placés une semaine de plus en hypoxie chronique (4 semaines), il avait alors été observé l'apparition de lésions plexiformes (157). Ce modèle qui paraissait très intéressant nécessitait des compléments de caractérisation que nous avons effectués au cours de ma thèse (Coste *et al.*, soumis). Ce modèle a pour avantages d'être mis en œuvre facilement de se développer relativement rapidement. En outre, il permet d'observer les altérations caractéristiques de l'HTAP et de l'HTP sévère (en particulier les lésions plexiformes et thrombotiques).

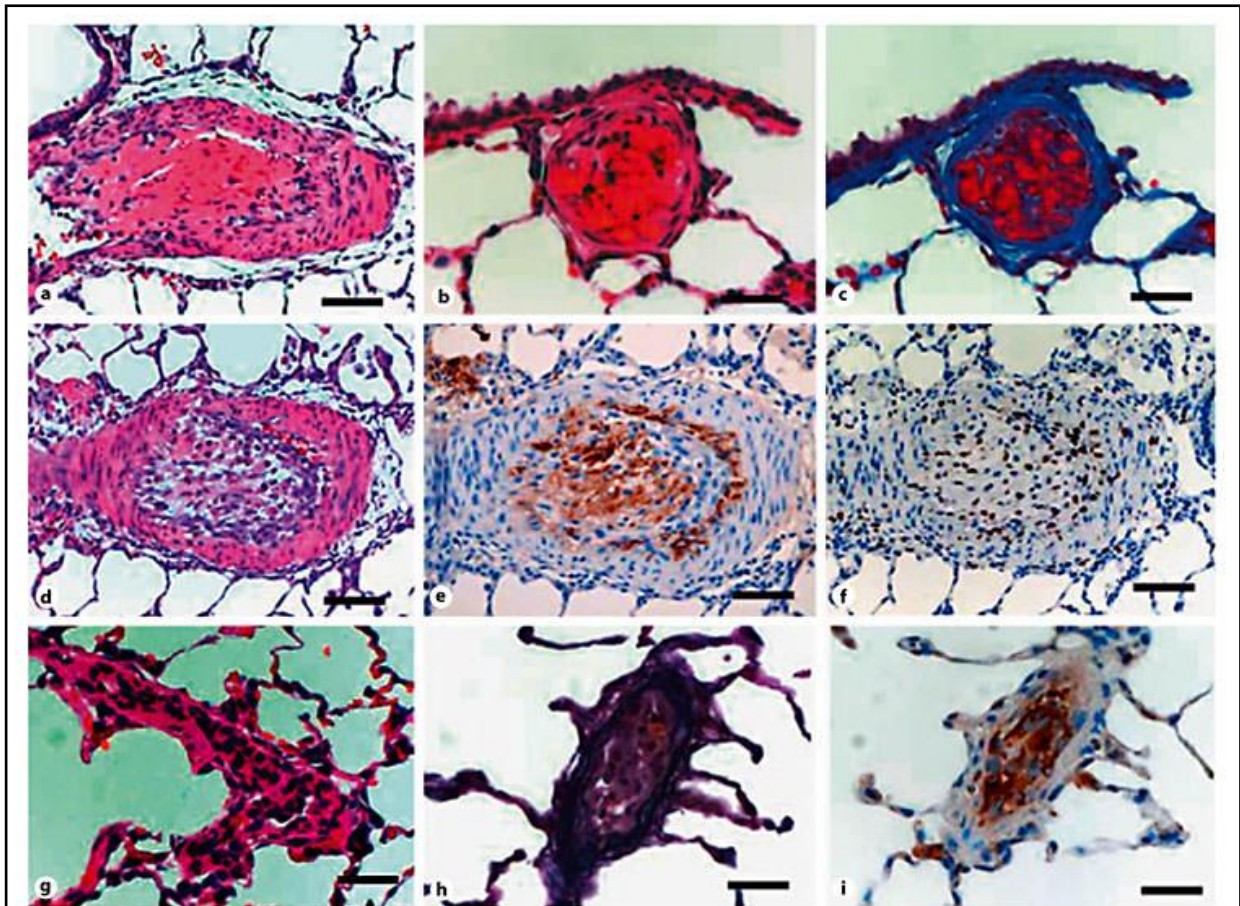


Figure 17 : Lésions complexes observées dans le modèle combiné associant l'injection de MCT et l'hypoxie chronique

D'après (157)

A = Thrombus dans la lumière artérielle pulmonaire. B, C = occlusion totale de la lumière artérielle avec un thrombus de fibrine. D, E et F = vue de l'artère transversale d'une lésion avec occlusion luminale par la prolifération endothéliale. G : vue longitudinale d'une lésion plexiforme. A, B, D and G : coloration éosine-hématoxyline. C : coloration de Picro-Mallory. H : coloration de van Gieson. E, I : immunomarquage du facteur VIII. F : immunomarquage du KI-67.

3.4. Nouvelles pistes de traitements

3.4.1. Traitements en voie de développement

3.4.1.1. Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine

L'augmentation de la libération de sérotonine chez les patients atteints d'HTP par l'endothélium est connue. Cette augmentation entraîne une plus grande prolifération des CML et favorise la vasoconstriction (159, 160). Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine pourraient être associés avec une diminution du développement de l'HTP et de la mortalité chez les patients atteints d'HTP (161, 162), ainsi que dans des modèles animaux mimant l'HTP (163). Ces molécules, en bloquant le transport de la sérotonine, empêcheraient l'internalisation de la sérotonine qui n'entraînerait alors pas l'activation des voies responsables du remodelage des artères pulmonaires. Toutefois, lors des essais cliniques, ces molécules (fluoxétine, paroxétine, sertraline) n'ont pas montré d'effet bénéfique dans le traitement de l'HTP (164). Une autre étude a même constaté que ces molécules entraînaient une dégradation clinique et une augmentation de la mortalité (165). Il faudrait certainement conduire des études prospectives ayant pour but de décrire l'intérêt éventuel de ces molécules afin de pouvoir conclure.

3.4.1.2. Inhibiteurs de Rho-kinase

La voie RhoA (petite protéine G)/ROCK (RhoA kinase) est activée de manière excessive dans l'HTP, et participe au remodelage vasculaire et à la vasoconstriction (166, 167). Le fasudil est un inhibiteur de ROCK qui permet de diminuer les signes de l'HTP dans les modèles animaux (168-170). Les essais cliniques ont pu montrer que l'utilisation du fasudil en intraveineux améliore la vasoconstriction chez les patients atteints d'HTP (171, 172). De plus, lors d'un essai en double-aveugle et contrôle *versus* placebo, le fasudil hydrochloride a entraîné une diminution des pressions et de l'index cardiaque, même si il n'y avait aucune différence sur le 6MWD (173).

3.4.1.3. Modulateurs de l'immunité et de l'inflammation

L'inflammation périvasculaire et vasculaire est un des principaux aspects physiopathologiques de l'HTP. En effet, les observations dans les modèles animaux ont suggéré que le phénomène d'inflammation dans l'HTP pourrait précéder le remodelage vasculaire (174, 175). Cette inflammation est à la fois due à une infiltration plus importante de cellules inflammatoires et à une augmentation de sécrétion de cytokines et de chimiokines (175, 176). Dans des modèles d'HTP chez l'animal, l'inhibition de cibles de l'inflammation, telles que : TRAIL (« tumor necrosis factor–related apoptosis inducing ligand »), TGF- β , CD 20, et IL-1, ont pu améliorer les symptômes de la maladie (177). Des agents immunosuppresseurs comme la dexaméthasone, le mycophénolate mofétil, ou la cyclosporine ont eux aussi pu inhiber l'HTP dans différents modèles animaux (178, 179).

Un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, le rituximab, est actuellement à l'étude dans le traitement de l'HTAP associée à une sclérodémie systémique (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01086540). L'utilisation de cette molécule pourrait être simplifiée, car elle a déjà obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour d'autres indications et est déjà très utilisée dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

D'autres cibles pourraient être intéressantes, comme l'IL-6 qui est surexprimée dans l'HTAP et est corrélée avec la mortalité (57, 58). Son ciblage pourrait être étudié à l'aide d'un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-6 (tocilizumab) (180). Chez une patiente atteinte d'HTAP secondaire à une artérite de Takayasu, et résistante aux traitements conventionnels de l'HTAP, une équipe a tenté un traitement par tocilizumab, et celui-ci a permis de diminuer la PAPm, les RVP et de réduire la dyspnée (181).

3.4.1.4. Ciblage du peptide intestinal vasoactif (VIP)

Le VIP est une hormone neuropeptidique qui induit une vasodilatation pulmonaire, inhibe la prolifération vasculaire des CML, l'agrégation plaquettaire, et a des propriétés anti-inflammatoires (179). Le VIP agit par l'intermédiaire de sa liaison avec ses récepteurs couplés aux protéines G (VPAC1, VPAC2, PAC1), et peut stimuler la voie de signalisation de l'adénylate cyclase, activer la phospholipase-D et les RhoA-GTPases. Les taux de VIP

pulmonaire et sérique sont diminués chez les patients atteints d'HTP, mais on observe aussi une augmentation de l'expression des récepteurs du VIP (VPAC-1, VPAC-2) (182). Une étude clinique menée avec 20 patients atteints d'HTP recevant une dose unique de 100µg d'aviptadil, un analogue du VIP, a montré une vasodilatation pulmonaire, et chez 6 d'entre eux il y a même eu une diminution de 20% des résistances artérielles pulmonaires (183).

3.4.1.5. Les microARN

Les microARN (miARN) sont une catégorie de petits ARN non-codants qui régulent différents processus biologiques comme la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire. Les miARN sont associés au développement de beaucoup de cancers et, du fait du grand nombre de recoupement de voies entre l'HTP et le cancer (184), leur étude paraît pertinente.

Les différents miARN peuvent avoir des effets opposés dans l'HTP (185) : délétères pour miR-322 et -451(185) ou protecteurs pour miR-204 (186) et miR-424 et -503 (187). Du fait de ces effets opposés, deux stratégies peuvent être envisagées : proposer d'inhiber ou au contraire de mimer les effets de ces différents miARN.

L'inconvénient majeur de ces traitements vient des effets multiples de chaque miARN. Ainsi les miARN ayant des fonctions spécifiques sont plus intéressants. Des essais cliniques ciblant les miARN commencent dans d'autres pathologies, comme par exemple l'hépatite C (179).

3.4.1.6. Rôle potentiel de progéniteurs cellulaires dans l'HTP

L'HTP est associée à une perte ou à une altération de l'endothélium. Une hypothèse thérapeutique a voulu tester la délivrance de progéniteurs endothéliaux (EPCs). Les EPCs sont principalement trouvés dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique. Ces EPCs sont caractérisés par la co-expression de plusieurs marqueurs : CD34, CD133 et KDR (récepteur de domaine kinase) (188, 189) . Le nombre d'EPCs périphériques chez les patients atteints d'HTP semble être diminué dans certaines études (179, 190). Des traitements avec des EPCs autologues (provenant du sujet lui-même) ont pu inhiber l'HTP dans des modèles animaux (179, 191). Malgré le fait que beaucoup d'études aient montré l'innocuité de ce

traitement, il faudra confirmer ces résultats et valider l'absence d'effets indésirables (192-194).

3.4.1.7. Les inhibiteurs de tyrosine kinase et les facteurs de croissance

Dans l'HTP, on observe une prolifération importante des CE et des CML. Certains facteurs de croissance ont été décrits comme étant associés au développement de l'HTP, et plus précisément à la vasoconstriction et au remodelage des artères pulmonaires. Ces facteurs de croissance mis en évidence sont notamment l'épidermal growth factor (EGF) (195), le fibroblast growth factor (FGF) (196, 197), le platelet-derived growth factor (PDGF) (198, 199), le transforming growth factor- β (TGF- β) (54, 194, 200), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF (201), le facteur de croissance vasculaire plasmatique A ou « plasma vascular endothelial growth factor A » (202), et facteur de croissance des hépatocytes ou « hepatocyte growth factor » (HGF) (203). De plus nous avons pu, dans notre laboratoire, mettre en évidence un rôle important du facteur de croissance des nerfs (« Nerve growth factor » = NGF) dans le développement des principaux aspects physiopathologiques de l'HTP (76) (Coste *et al.*, en préparation).

La voie du PDGF (« platelet-derived growth factor ») a été étudiée comme nouvelle cible thérapeutique (105), notamment en utilisant des inhibiteurs de tyrosine-kinase. Le traitement par l'une de ces molécules, l'imatinib, a montré une amélioration des paramètres hémodynamiques et de la capacité physique (204, 205). Toutefois une augmentation de l'incidence des hémorragies sous-durales, une cardiotoxicité et des effets indésirables graves et inattendus (par exemple : dyspnée, pneumonie, insuffisance rénale...) ont été observés chez les patients. C'est pourquoi il a été décidé d'arrêter le développement de cette molécule comme traitement potentiel de l'HTAP (206).

Toutefois, d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase sont actuellement à l'étude. En particulier, le nilotinib possède une action pharmacologique similaire à l'imatinib en inhibant le récepteur du PDGF, c-kit et c-abl, et est actuellement en essais cliniques de phase II pour l'HTAP (clinicaltrials.gov, NCT01179737) (194).

Le sorafenib est un inhibiteur multikinases qui cible c-kit, le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (« vascular endothelial growth factor », VEGF), Raf et d'autres kinases cibles. En essai clinique, en association avec des prostanoides, les seuls effets indésirables rapportés ont été des réactions cutanées modérées, des alopecies et des diarrhées. Toutefois, il n'a pas été observé d'amélioration sur le plan clinique des patients, le 6-MWT restant inchangé, et la fonction cardiaque (DC) restant détériorée. Ce dernier élément pousse à s'interroger sur l'efficacité réelle de cette molécule (194, 207).

Un effet indésirable majeur, la cardiotoxicité, pourrait facilement faire obstacle à l'utilisation de cette famille de molécules, malgré les progrès intéressants que peuvent représenter les inhibiteurs de tyrosine kinase. En outre, ce phénomène de cardiotoxicité est favorisé par une anomalie cardiaque sous-jacente (208). Or l'HTP est le plus souvent compliquée d'une insuffisance cardiaque droite. Le traitement par des inhibiteurs de tyrosine kinase dans l'HTP serait donc un facteur de risque supplémentaire de développer une cardiotoxicité. Les mécanismes de cardiotoxicité ne sont pas totalement élucidés. Des expériences menées sur des souris ont montré qu'en présence de fortes doses d'imatinib, une toxicité cardiaque apparaît. Des cardiomyocytes préalablement transfectés avec un gène codant pour le récepteur c-Abl résistant à l'imatinib, mis en présence de fortes doses d'imatinib, sont au moins partiellement protégés de la toxicité induite par l'imatinib (209).

En conclusion, malgré les résultats décevants obtenus à l'aide des premiers inhibiteurs de tyrosine-kinase testés, le ciblage des facteurs de croissance reste une option thérapeutique intéressante et toujours à l'étude actuellement dans le but de cibler le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTP. Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression d'un autre facteur de croissance, le facteur de croissance des nerfs ou NGF, et son rôle potentiel dans cette maladie.

3.4.2. Une hypothèse thérapeutique : le NGF ?

3.4.2.1. Généralités sur le NGF

Le facteur de croissance des nerfs ou NGF (« Nerve Growth Factor ») a été découvert en 1951 par Rita Levi-Montalcini et collaborateurs (210). Le NGF appartient à la famille des neurotrophines qui comprend également chez l'Homme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (ou BDNF, « Brain-derived neurotrophic factor ») et les neurotrophines -3 (NT-3) et -4/5 (NT-4/5) (211). Isolé à l'origine à partir de venin de serpent, ou extrait de glandes sous-maxillaires de souris (212), il a été montré depuis que le NGF est synthétisé et sécrété par un très grand nombre de types cellulaires différents, en particulier des cellules neuronales, inflammatoires, mais aussi structurales, comme des cellules endothéliales ou musculaires lisses de diverses origines (211).

Le NGF a été décrit au départ comme un médiateur indispensable à la croissance et à la survie des neurones (212). Il est d'ailleurs à l'étude actuellement comme cible thérapeutique dans plusieurs maladies neurodégénératives, en particulier dans la maladie d'Alzheimer (213, 214). Néanmoins, de nombreuses études ont montré, depuis sa découverte, que le NGF joue également d'autres rôles en dehors du système nerveux, et en particulier dans les voies aériennes (211).

- Structure du NGF

Chez la souris, le NGF est composé de trois types de sous-unités : α , β et γ . Ces 3 sous-unités sont associées pour former un complexe nommé le « 7S-NGF » de haut poids moléculaire.

Chez l'Homme, seule la sous-unité β a pu être mise en évidence et on lui donne communément le nom de β -NGF. Cette sous-unité β , de poids moléculaire 46 kDa, porte l'activité biologique sous forme de dimère (215).

Chaque monomère β est constitué de 118 acides aminés et a une forme allongée, dont la partie centrale est composée de deux paires de feuilletts β disposés de manière antiparallèle (216). A une extrémité, il existe trois boucles en épingle à cheveux (« hairpin loops ») ; l'autre extrémité porte un motif appelé nœud de cystéine (« cysteine knot ») qui stabilise la

conformation de la molécule. Ce nœud de cystéine est formé par 3 ponts disulfures (216). Deux monomères s'assemblent de manière parallèle grâce à des liaisons hydrogène et des liaisons hydrophobes, afin de former un homodimère biologiquement actif (211, 217) ; Figure 18.

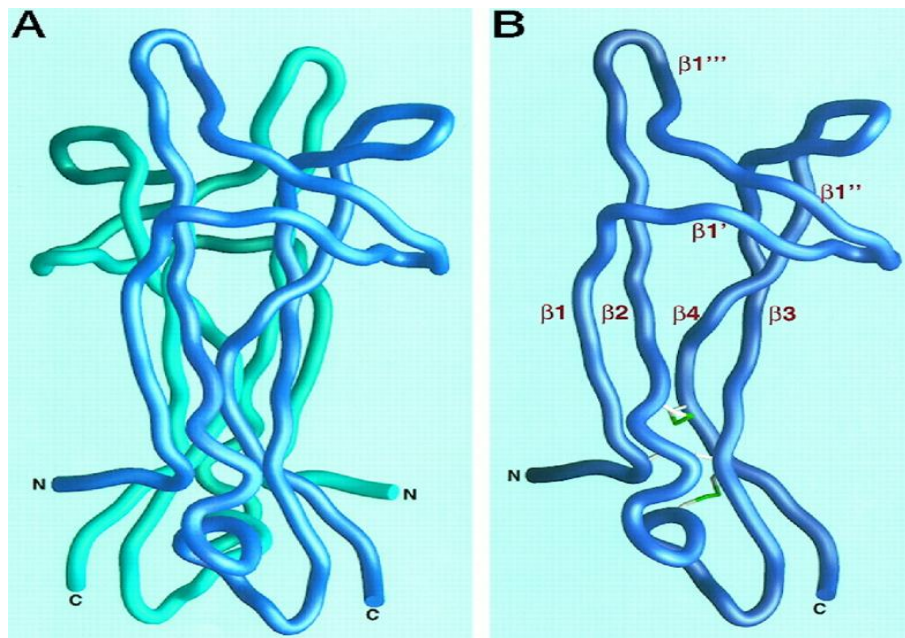


Figure 18 : Structure du β -NGF

D'après (217)

A : Représentation en trois dimensions de la forme active dimérisée du β -NGF. B : Monomère de β -NGF. Les trois ponts disulfures sont représentés en vert. C et N désignent respectivement les extrémités C- et N-terminales de chaque monomère.

- Transcription et traduction du NGF

Le gène codant pour le β -NGF est situé sur le bras court du chromosome 1 chez l'Homme, sur le chromosome 3 chez la souris. La structure du gène du β -NGF est la même quelle que soit l'espèce : 6 exons et 4 introns (218). Néanmoins, leurs tailles diffèrent entre les espèces : chez l'Homme le gène est de 60 kDa, alors que chez la souris il est de 43 kDa (218).

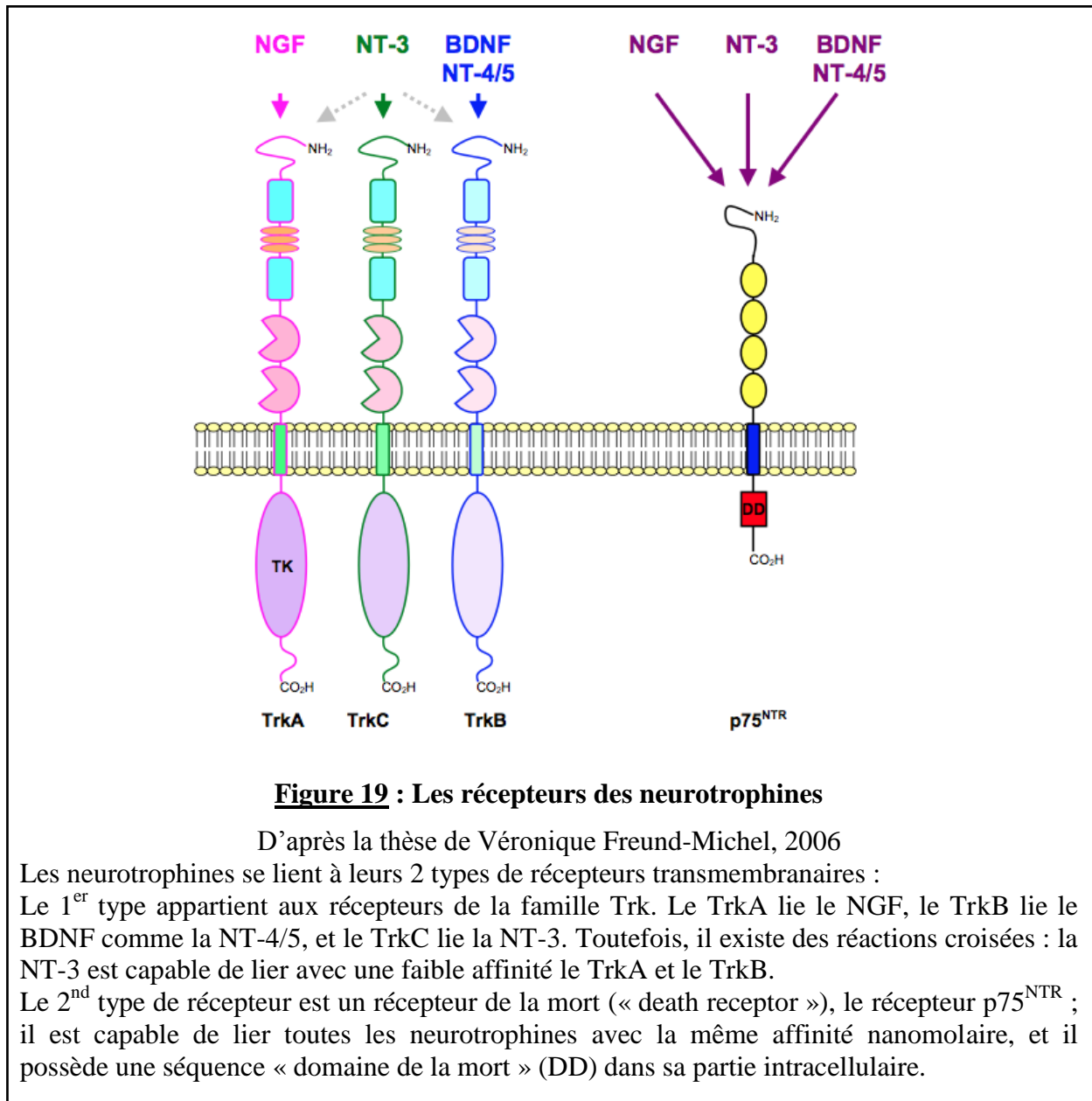
Les transcrits du β -NGF existent sous quatre formes (A, B, C et D). Toutefois seule la forme A et la forme B ont déjà été décrites chez l'Homme (219). Le transcrit A code pour le précurseur du β -NGF de 34 kDa. Le transcrit B fait suite à l'épissage alternatif de l'exon 2 qui code pour le précurseur du β -NGF de 27 kDa (219).

En conditions inflammatoires, la transcription de l'ARNm du β -NGF est augmentée dans les neurones (220). Dans d'autres types cellulaires, tels que dans les cellules structurales comme les fibroblastes, les cellules épithéliales ou encore les CML, en présence de TNF- α ou d'IL-1 β , l'ARNm du NGF est augmenté (221-223). Cette augmentation de l'expression du NGF est à la fois liée à la stabilisation de l'ARNm et à l'activation de la transcription du NGF (211). Le traitement des cellules à l'aide de glucocorticoïdes (comme par exemple la dexaméthasone) diminue le taux d'ARNm du NGF jusqu'à son niveau de base et ce, même après stimulation par une condition inflammatoire (221, 223).

La traduction du NGF, à partir des 2 transcrits majoritaires A et B, permet d'obtenir respectivement deux pré-pro-NGF de 34 et 27 kDa. Le clivage de la séquence au niveau du réticulum endoplasmique conduit au pro-NGF de 32 et 25 kDa (218, 219). Le pro-NGF avait d'abord été considéré comme une forme intermédiaire du NGF mature, et l'on pensait qu'il devait systématiquement être clivé pour donner du NGF biologiquement actif. Des études ultérieures ont pu montrer que le pro-NGF est la forme majoritaire de NGF et a la capacité de se lier directement sur les mêmes récepteurs que le NGF (224).

3.4.2.2. Les récepteurs du NGF et leurs voies de signalisation

Le NGF induit ses effets via l'activation de deux récepteurs distincts : le récepteur TrkA (« tropomyosin-related kinase A ») qui est le récepteur à haute affinité pour le NGF, et le récepteur p75^{NTR} (récepteur p75 des neurotrophines) qui est le récepteur à faible affinité pour le NGF. Les pro-neurotrophines ont aussi la capacité de se lier aux récepteurs Trk et p75^{NTR}, mais avec une plus faible affinité pour les récepteurs Trk que pour le récepteur p75^{NTR} (225, 226) ; Figure 19.



3.4.2.2.1. Le récepteur TrkA

➤ Généralités et structure

Le récepteur TrkA (140 kDa) lie le NGF avec une haute affinité (de l'ordre du picomolaire) et possède une activité tyrosine-kinase intrinsèque (227, 228). Le récepteur TrkA est aussi capable de lier le pro-NGF avec une affinité plus faible. Chaque récepteur de la famille Trk a un ligand préférentiel. Ainsi le récepteur TrkA lie préférentiellement le NGF, le

TrkB lie le BDNF comme la NT-4/5, et le TrkC lie la NT-3. Toutefois, il peut exister des réactions croisées. En effet, la NT-3 est capable de se lier avec une plus faible affinité aux récepteurs TrkA et TrkB (229).

Le récepteur TrkA est une glycoprotéine de 140 kDa, codée par un gène situé sur le chromosome 1. Il est composé d'une unique hélice transmembranaire avec un domaine extracellulaire permettant la liaison du NGF, et un domaine intracellulaire portant une activité tyrosine-kinase intrinsèque (216). Le domaine extracellulaire du TrkA comprend 5 domaines différents, dénommés D1 à D5 : D1 et D3 contiennent des motifs répétitifs riches en cystéine, D2 contient 3 domaines riches en leucine, alors que D4 et D5 sont les domaines en charge de la liaison avec le NGF (216, 230). Il existe différentes isoformes du TrkA, qui peuvent aussi être observées sous leur forme soluble après clivage de leur domaine extracellulaire, et qui mènent à une activation indépendante de leur ligand par l'activation directe de leur kinase intracellulaire (231, 232).

Le récepteur TrkA est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, notamment au niveau des cellules du système nerveux central et périphérique chez l'Homme (233), mais aussi sur des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T (234), les lymphocytes B (235), les mastocytes (236), les éosinophiles (237), les basophiles (238), les monocytes et les macrophages (239), ou encore sur les cellules structurales comme les fibroblastes (221), les cellules musculaires lisses vasculaires et bronchiques (240).

➤ Les voies de signalisation du récepteur TrkA

La liaison du NGF induit une dimérisation du récepteur TrkA et conduit à l'activation des kinases intrinsèques par transphosphorylation (217, 241). Chaque domaine kinase d'un monomère induit la phosphorylation de l'autre monomère. De cette manière, 6 résidus tyrosine sont phosphorylés : Tyr670, Tyr674, et Tyr674 qui sont situés à l'intérieur du domaine kinase et dont la phosphorylation augmente l'activité catalytique de la tyrosine-kinase qui peut ensuite phosphoryler les résidus Tyr490, Tyr751 et Tyr785 situés à l'extérieur du domaine tyrosine-kinase.

La reconnaissance de la phosphorylation de ces tyrosines est faite par des molécules effectrices possédant un domaine SH2 et va permettre la propagation du signal dans la cellule (242).

L'activation du récepteur TrkA par le NGF conduit à 3 voies de signalisation majeures : la voie de la petite protéine G Ras, la voie PLC/PKC (Phospholipase C/Protéine kinase C) et la voie de la PI3K (Phosphatidyl inositol-3 kinase) ; Figure 20.

- La voie Ras/Raf

La phosphorylation du récepteur TrkA permet le recrutement de la protéine adaptatrice « Growth factor receptor bound protein-2 » (Grb2) (243). Grb2 s'associe avec le facteur « son of sevenless » (Sos) qui active, par échange d'une molécule de GDP en GTP, la petite protéine G Ras (244). Quand Ras lie le GTP, elle active la kinase de Raf (RafK), conduisant à l'activation de Raf par phosphorylation (245) et l'activation de la « mitogen-activated protein kinase » (MAP-kinase) ERK 1/2 (« extracellular regulated protein kinase » 1/2). Celle-ci conduit alors à l'activation de facteurs de transcription conduisant à la prolifération et la survie cellulaires.

- La voie PLC/PKC (Phospholipase C/Protéine kinase C)

La voie de la PLC et des PKC est une autre voie possible. Au niveau du récepteur TrkA phosphorylé, la PLC γ est recrutée et clive le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate pour former ses deux messagers secondaires : l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ peut alors se lier à son récepteur exprimé sur le réticulum endoplasmique et induire une libération de calcium intracytoplasmique. En synergie, le DAG active les PKC (246). Ces voies conduisent à l'activation des MAP-kinases ERK, p38 et JNK (« c-jun N-terminal kinase »), induisant à terme la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaires.

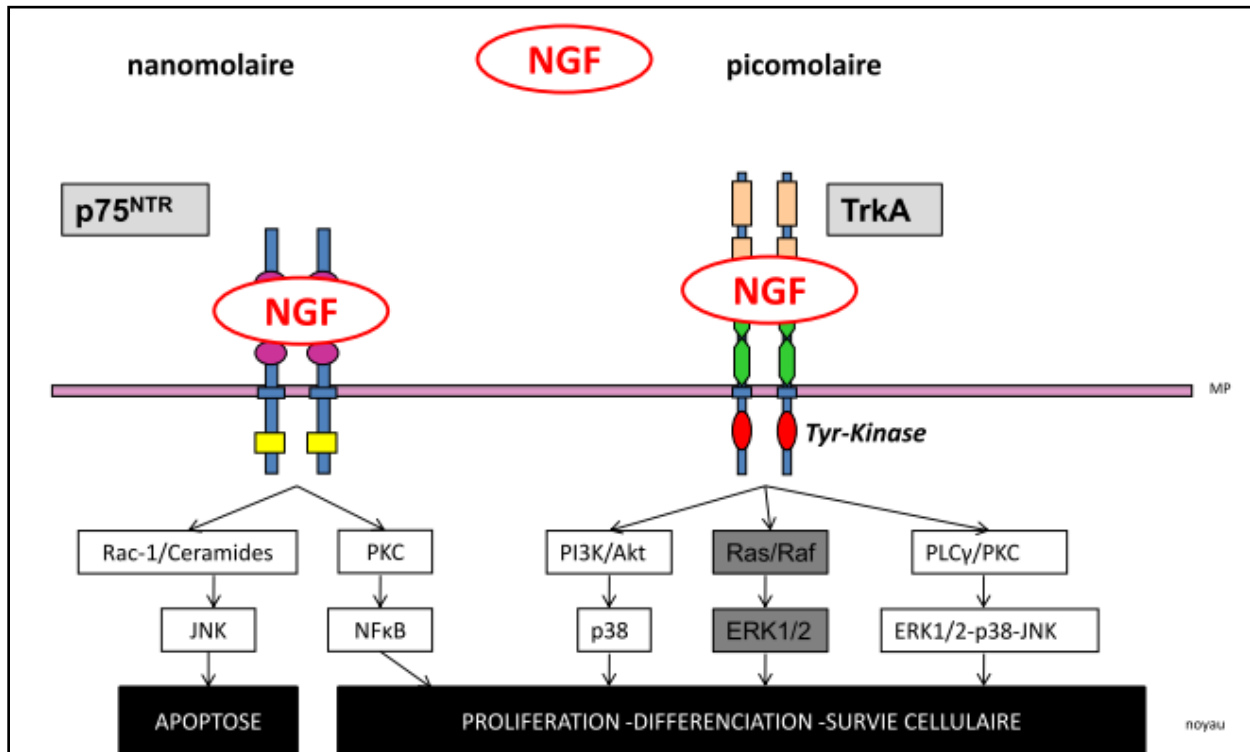


Figure 20 : Les voies de signalisation du NGF

D'après la thèse de Fanny Laroumanie

La fixation du NGF sur le récepteur TrkA conduit à l'activation de 3 voies majeures : la voie PI3K / Akt / p38, la voie Ras/ Raf/ ERK1/2 et la voie PLC γ / PKC/ ERK-p38-JNK. Ces voies stimulent la transcription des gènes et participent à la prolifération et à la survie cellulaire. L'activation du récepteur p75^{NTR} peut aboutir à deux effets opposés : la stimulation de la voie PKC / NF- κ B active la transcription des gènes de survie, alors que la stimulation de la voie Rac-1-Céramides/JNK induit la transcription de gènes pro-apoptotiques.

JNK : C-jun N-terminal kinase, MP : membrane plasmique, p75^{NTR} : récepteur p75 des neurotrophines, PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase, PLC : phospholipase C, PKC : protéine kinase C, Tyr-kinase : tyrosine kinase, TrkA : Tropomyosine-related kinase A, ERK : extracellular-regulated protein-kinase.

- La voie de la PI3K (Phosphatidyl inositol-3 kinase)

L'activation du récepteur TrkA peut conduire à une troisième voie : l'activation de la PI3K et la formation de phosphatidylinositol-3,4 biphosphate (PIP₃). Ainsi, la « 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 » (PDK1) est recrutée à la membrane et interagit avec le PIP₃ via un domaine PH (pleckstrin-homology), permettant le recrutement et l'activation de la protéine kinase B (PKB, aussi appelée protéine Akt). PKB induit alors

l'activation de la transcription de gènes de manière MAPK-indépendante ou dépendante (247, 248).

3.4.2.2.2. Le récepteur p75^{NTR} (ou récepteur p75 des neurotrophines)

➤ Généralités et structure

Le récepteur p75^{NTR}, appartenant à la famille des récepteurs de la mort (« death receptors »), est une glycoprotéine de 75 kDa ; son gène est situé sur le chromosome 17 (249). Ce récepteur est constitué par une seule hélice transmembranaire. Son domaine extracellulaire est composé de quatre domaines riches en cystéine ou « Cystein-rich domain » (CRD1 à 4). Ces domaines, grâce à leurs charges négatives, permettent la liaison des neurotrophines. Enfin, le domaine intracellulaire présente deux domaines d'interaction avec des protéines adaptatrices : un domaine juxtamembranaire ou « chopper domain » (JM) et un domaine de la mort ou « death domain » (DD). Ce domaine de la mort est caractéristique de la famille des récepteurs de la mort : il est capable d'activer les voies de l'apoptose ou mort cellulaire programmée.

Le récepteur p75^{NTR} possède une faible affinité pour le NGF (de l'ordre du nanomolaire). Il est également moins sélectif et peut lier les autres neurotrophines avec la même affinité nanomolaire (227). C'est, par contre, le récepteur à haute affinité des pro-neurotrophines (224).

Le récepteur p75^{NTR} est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, notamment les cellules des systèmes nerveux central et périphérique (250), mais aussi les cellules inflammatoires telles que les lymphocytes B (235), les macrophages (251) et les éosinophiles (237), ou encore les cellules structurales vasculaires, notamment les CML (252, 253) et les CE (253, 254).

➤ Les voies de signalisation du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR}, comme le récepteur TrkA, s'active en se dimérisant. Cette dimérisation conduit à 2 effets majeurs : l'apoptose par l'activation de la MAPK JNK, ou la survie cellulaire par l'activation du facteur de transcription « nuclear factor-κB » (NF-κB).

Ces deux effets opposés sont obtenus en fonction du type cellulaire, de la nature du ligand, des protéines adaptatrices et des co-récepteurs éventuellement recrutés (227).

- Voies de signalisation pro-apoptotiques

Les voies de signalisation du p75^{NTR} qui mènent vers l'apoptose impliquent la MAPK JNK, suite à l'activation de 3 voies possibles : le recrutement de protéines adaptatrices, la synthèse de céramides, ou encore l'activation de la petite protéine G Rac-1. JNK peut alors phosphoryler les protéines pro-apoptotiques telles que Bad, p53 et Bax. Cela mène, de manière séquentielle, à l'induction du cytochrome c provenant de la mitochondrie et à l'activation de la voie des caspases menant vers l'apoptose (255).

- Voies de signalisation anti-apoptotiques

L'activation du récepteur p75^{NTR} peut aussi conduire vers la survie cellulaire, via l'activation du facteur de transcription NF-κB par 3 voies majeures : le recrutement de protéines adaptatrices de la famille « TNF receptor-associated factor » (TRAF) et l'activation d'une PKC atypique (PKC_ι), le recrutement d'une autre protéine adaptatrice « receptor interacting protein-2 » (RIP-2), et l'activation de la PI3K. NF-κB peut ensuite migrer vers le noyau et induire la transcription de gènes à activité anti-apoptotique (211).

3.4.2.3. Rôles potentiels du NGF dans l'HTP

A l'origine du projet « NGF et HTP » dans notre équipe, plusieurs données de la littérature suggéraient un rôle du NGF dans cette pathologie.

3.4.2.3.1. Expression du NGF et de ses récepteurs dans l'HTP

La littérature avait déjà montré, notamment par immunohistochimie sur coupes de poumon entier et par Western blotting, que le NGF et ses deux récepteurs étaient exprimés au niveau des artères pulmonaires humaines (253, 256, 257).

Cependant, aucune étude plus précise n'avait été réalisée jusqu'alors concernant l'expression du NGF et de ses récepteurs dans les différents types cellulaires des artères pulmonaires. Toutefois, des données de la littérature montraient l'expression du NGF par des cellules structurales bronchiques telles que les fibroblastes (221), les cellules épithéliales (223) ou les cellules musculaires lisses bronchiques (222, 256). De plus, de nombreuses études avaient montré que certaines cellules inflammatoires pouvaient elles aussi synthétiser du NGF, telles que les lymphocytes T (234), les lymphocytes B (235), les mastocytes (258), les éosinophiles (259) et les macrophages (256). Ainsi, les cellules structurales des artères pulmonaires, les cellules structurales bronchiques avoisinantes, de même que les cellules inflammatoires infiltrées pouvaient être des sources potentielles de NGF dans l'HTP. De plus, ces mêmes cellules expriment les récepteurs du NGF, en particulier les différents types cellulaires artériels pulmonaires (256, 257), les cellules structurales bronchiques (256, 260), et différents types de cellules inflammatoires (cf parties généralités sur les 2 récepteurs).

3.4.2.3.2. Rôles physiopathologiques potentiels du NGF dans l'HTP

Des travaux précédents avaient montré un rôle du NGF dans la régulation du tonus vasculaire dans la circulation systémique (261), et une expression augmentée du NGF dans l'hypertension artérielle systémique (262). Ainsi, ces résultats suggéraient un rôle à la fois physiologique et physiopathologique dans les vaisseaux sanguins systémiques.

Le rôle du NGF n'avait jusqu'alors pas été étudié dans la physiologie et physiopathologie vasculaire pulmonaire. L'HTP présente des caractéristiques physiopathologiques communes avec l'asthme : inflammation, hyperréactivité et remodelage tissulaire. Ces caractéristiques touchent respectivement les artères pulmonaires pour l'HTP (54) ou les bronches pour l'asthme (263). Or un rôle du NGF avait pu être précédemment mis en évidence dans l'asthme, avec une implication dans ces trois aspects physiopathologiques.

➤ NGF et inflammation pulmonaire

Des études avaient été réalisées *in vivo* dans différents modèles animaux d'asthme et montraient une diminution du phénomène d'inflammation au niveau des voies respiratoires à

l'aide d'anticorps bloquants anti-NGF : diminution du taux de cytokines IFN- γ , IL-4 et IL-5 (264, 265). De plus, après sensibilisation et provocation allergique, une plus grande inflammation au niveau pulmonaire avait été observée chez une souris transgénique surexprimant le NGF dans les poumons, en comparaison à des souris contrôles (264).

Les mécanismes expliquant le rôle du NGF dans l'inflammation avaient été confirmés en utilisant des anticorps bloquants anti-p75^{NTR} dans un modèle murin d'asthme, et chez des souris dont le gène codant pour le récepteur p75^{NTR} était invalidé (266, 267). Le récepteur TrkA semblait lui aussi impliqué puisque l'administration intranasale d'un « leurre » pan-Trk (composé soluble mimant la partie extracellulaire des récepteurs Trk) dans un modèle murin d'asthme avait permis une diminution de l'inflammation, en particulier une diminution des taux de cytokines IL-4 et 5 (268). Ainsi, ces données montraient que le NGF, via ses deux récepteurs, pouvait jouer un rôle de médiateur de l'inflammation dans le poumon, et suggéraient que le NGF pouvait donc également contribuer aux phénomènes inflammatoires associés à l'HTP.

➤ NGF et réactivité tissulaire

Plusieurs études avaient montré que le NGF jouait un rôle dans l'hyperréactivité bronchique. En effet, le NGF pouvait induire une hyperréactivité bronchique à des agents contractiles tels que des agonistes du récepteur NK-1 (269). Au contraire, l'administration d'anticorps bloquants anti-NGF chez la souris abolissait l'hyperréactivité bronchique après sensibilisation et provocation allergique (270). L'administration intranasale d'un « leurre » pan-Trk dans un modèle murin d'asthme permettait une diminution de l'hyperréactivité bronchique (268), de la même façon qu'en utilisant le K252a, un inhibiteur de tyrosine kinase, notamment des récepteurs Trk (270). De plus, l'hyperréactivité bronchique était réduite chez des souris asthmatiques dont le gène codant pour le récepteur p75^{NTR} avait été invalidé (266, 267). Ainsi, ces résultats montraient un rôle du NGF et de ses deux récepteurs dans l'hyperréactivité bronchique, et suggéraient que le NGF pouvait donc également participer à l'hyperréactivité d'autres tissus, en particulier l'hyperréactivité vasculaire pulmonaire dans l'HTP.

➤ NGF et remodelage tissulaire

Un rôle du NGF avait été identifié précédemment dans le remodelage bronchique. En effet, des études précédentes montraient que le NGF pouvait stimuler la prolifération des CML bronchiques par l'activation du récepteur TrkA et pouvait ainsi contribuer à l'épaississement du muscle lisse bronchique *in vivo* dans l'asthme (271, 272). De plus, des effets du NGF avaient été montrés précédemment sur les vaisseaux et les cellules vasculaires d'origine systémique. En effet, l'injection chronique de NGF chez le rat conduisait à un épaississement de la paroi des artères caudales ou mésentériques (273). De plus, le NGF induisait la prolifération et la migration des CE (274) et des CML vasculaires d'origine systémique (275). Ces résultats suggéraient donc que le NGF pouvait également contribuer au remodelage des artères pulmonaires dans l'HTP.

Ainsi, l'ensemble des données de la littérature, à l'origine de ce projet, suggérait que l'expression du NGF pouvait être modifiée dans l'HTP, et que ce facteur pouvait jouer un rôle à la fois dans l'hyperréactivité, l'inflammation et le remodelage vasculaires pulmonaires, trois aspects physiopathologiques majeurs dans cette maladie. Les traitements actuellement disponibles de l'HTP étant des traitements essentiellement symptomatiques, le but de ce projet a été d'évaluer le NGF comme cible thérapeutique potentielle dans cette pathologie (76). Les traitements étant particulièrement limités et peu efficaces dans l'HTP sévère, nous avons évalué le rôle potentiel du NGF dans un modèle d'HTP sévère combinant injection de monocrotaline et 4 semaines d'hypoxie (Coste et al., en préparation).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Mes travaux de thèse se sont basés sur une approche translationnelle, portant à la fois sur des aspects diagnostiques et thérapeutiques, et menés en parallèle chez l'humain et chez le rat. Les résultats obtenus d'un point de vue observationnel chez l'homme ont ainsi permis d'évaluer l'apport de la tomодensitométrie dans la compréhension de la maladie et dans le développement de nouveaux outils de diagnostic. Les résultats expérimentaux obtenus ont permis quant à eux d'apporter des éléments de réponse concernant la pertinence des modèles animaux dans une meilleure compréhension de la pathologie humaine et le développement de nouvelles pistes de recherche thérapeutiques.

En collaboration avec le service d'imagerie thoracique cardio-vasculaire du CHU de Bordeaux, mon travail observationnel a porté sur l'utilisation de la tomодensitométrie afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'HTP et de l'HTP sévère dans la BPCO.

En effet, l'HTP est une complication fréquente de la BPCO, pouvant entraîner une morbidité et une mortalité plus élevée. Cependant, peu de données étaient disponibles jusqu'à présent sur les caractéristiques cliniques de l'HTP secondaire à la BPCO. En particulier, les liens entre HTP, obstruction bronchique avaient été très peu étudiés, et le rôle de l'emphysème était controversé. *Ainsi, dans un premier temps, les objectifs de notre travail ont été de décrire les caractéristiques cliniques et tomодensitométriques des patients atteints de BPCO avec ou sans HTP, puis d'étudier une corrélation éventuelle entre valeurs de PAPm et mesures par tomодensitométrie de l'épaisseur bronchique et de l'emphysème. L'hypoxie, l'élargissement de l'artère pulmonaire ont également été évalués [Publication n°1] (137).*

D'autre part, si l'HTP est une complication bien décrite de la BPCO, en revanche l'HTP sévère (HTPs) est une complication plus rare mais plus grave et beaucoup moins étudiée. Des travaux antérieurs avaient émis l'hypothèse que l'HTPs secondaire à une BPCO pourrait être liée à un phénotype particulier pouvant nécessiter une prise en charge spécifique. *Notre deuxième objectif a été d'utiliser la tomодensitométrie, chez des patients atteints de BPCO compliquée d'HTP sévère, afin de rechercher des modifications éventuelles du lit vasculaire in vivo pour appuyer l'hypothèse d'un phénotype spécifique en comparaison à des patients atteints de BPCO sans HTPs. De plus, l'utilisation d'un score combiné a été évaluée*

afin de prédire la présence de l'HTPs dans la BPCO et ainsi de sélectionner les patients devant subir un cathétérisme cardiaque droit [Publication n°2] (131).

En parallèle, dans une partie plus expérimentale, mon travail a porté sur la caractérisation complémentaire d'un modèle d'HTPs chez le rat précédemment développé au laboratoire. En effet, l'HTPs est une maladie qui contre-indique les biopsies chez les malades. En recherche, il est donc assez difficile d'obtenir des produits biologiques humains, d'où l'intérêt d'utiliser des modèles animaux pertinents qui reproduisent au mieux les caractéristiques physiopathologiques de la maladie humaine. Le modèle développé combinait injection de monocrotaline et hypoxie chronique pendant 3 semaines. *Notre objectif ici a été de travailler sur l'extension du protocole de 3 à 4 semaines de traitement, ce qui a permis d'obtenir dans ce modèle des paramètres plus sévères et l'apparition de lésions anatomopathologiques très proches de celles qui caractérisent la maladie chez l'homme [Publication n°3] (Coste et al, soumis).*

Enfin, l'HTP, et l'HTP sévère en particulier, sont des maladies pour lesquelles il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif. La recherche s'oriente actuellement vers l'étude approfondie des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le remodelage vasculaire pulmonaire, un aspect important dans la physiopathologie de cette maladie. Dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, un intérêt particulier est notamment porté au ciblage de facteurs de croissance. Ces facteurs, impliqués en particulier dans le remodelage vasculaire pulmonaire, semblent être de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses dans l'HTP. *Dans ce contexte, je me suis intéressée au facteur de croissance des nerfs NGF et à son rôle potentiel dans l'HTP. Dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence une augmentation d'expression du NGF ainsi qu'une augmentation d'expression et/ou d'activité de ses récepteurs dans l'HTP expérimentale et humaine. Nos résultats ont également démontré un rôle du NGF dans plusieurs aspects pathophysiologiques majeurs de cette maladie [Publication n°4] (76).*

A l'aide du modèle sévère caractérisé précédemment, nous avons également évalué l'intérêt thérapeutique potentiel de cibler le NGF dans l'HTPs, en étudiant notamment l'implication des récepteurs du NGF, le récepteur TrkA et le récepteur p75^{NTR}, dans l'inflammation et le remodelage des artères pulmonaires [Publication n°5] (Coste et al, en préparation).

RÉSULTATS

RÉSULTATS

Publication n°1

« Computed tomography measurement of airway remodeling and emphysema
in advanced COPD: correlation to pulmonary hypertension »

Gaël Dournes, François Laurent, **Florence Coste**, Claire Dromer, Elodie Blanchard,
François Picard, Fabien Baldacci, Michel Montaudon, Pierre-Olivier Girodet,
Roger Marthan et Patrick Berger

American journal of respiratory and critical care medicine 2014 ; 191 (1) : 63-70
(avec éditorial associé)

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une complication établie de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) avancée qui est associée à de plus fortes morbidité et mortalité. Les mécanismes pouvant expliquer l'HTP dans la BPCO sont mal connus. Une hypothèse voudrait que l'emphysème soit responsable de l'HTP, mais aucun lien n'a jamais pu être mis en évidence. De plus, l'association entre remodelage bronchique et HTP n'avait pas été étudiée jusqu'à présent. Dans ce travail, à l'aide de mesures quantitatives par tomодensitométrie, nous avons émis l'hypothèse d'une corrélation entre HTP et remodelage des voies aériennes.

Les données ont été extraites à partir de 60 patients atteints de BPCO ayant subi un cathétérisme cardiaque droit et un scanner dans une période de stabilité, et n'ayant aucune autre maladie susceptible de causer l'HTP. La mesure tomодensitométrique de l'épaisseur de la paroi bronchique a été utilisée afin d'évaluer leur remodelage, et le pourcentage d'aire pulmonaire avec une valeur de voxel inférieure à - 950 UH a été utilisé pour quantifier l'extension de l'emphysème.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que 34 des 60 patients atteints de BPCO avaient une HTP (PAPm \geq 25 mmHg). Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les patients BPCO avec ou sans HTP du point de vue de l'âge, du sexe, ou des résultats de la spirométrie. Par contre, nos résultats ont mis en évidence une hypoxémie et

un épaississement de la paroi bronchique plus importants chez les patients atteints de BPCO compliquée d'HTP. De plus, chez ces patients, l'épaississement de la paroi bronchique a pu être corrélé à la PAPm ($\rho = 0,62$; $p < 0,001$). Aucune différence significative n'a été mise en évidence au niveau de l'emphysème entre les deux groupes, et aucune corrélation n'a été identifiée entre emphysème et PAPm. Une analyse multivariée ($R^2 = 0,53$) a permis de montrer que le paramètre indépendant le plus associé à la PAPm était l'épaississement de la paroi bronchique en comparaison à la PaO_2 ou à l'élargissement du diamètre de l'artère pulmonaire en rapport avec celui de l'aorte.

En conclusion, ce travail a permis de mettre pour la première fois en évidence une association entre le remodelage de la paroi bronchique et l'HTP secondaire à la BPCO. Contrairement à la quantification de l'emphysème, la mesure par tomographie par ordinateur du remodelage des voies aériennes est corrélée à la PAPm et peut ainsi permettre d'estimer la sévérité d'une HTP secondaire à la BPCO. Les conséquences du remodelage bronchique ne sont donc pas limitées à l'altération des fonctions respiratoires pour expliquer la sévérité et la mortalité dans la BPCO.

http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201408-1423OC?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&#.V0cgpOSd5-w



Computed Tomographic Measurement of Airway Remodeling and Emphysema in Advanced Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Correlation with Pulmonary Hypertension

Gaël Dournes^{1,2,3}, François Laurent^{1,2,3}, Florence Coste^{1,2}, Claire Dromer³, Elodie Blanchard³, François Picard³, Fabien Baldacci⁴, Michel Montaudon^{1,2,3}, Pierre-Olivier Girodet^{1,2,3}, Roger Marthan^{1,2,3}, and Patrick Berger^{1,2,3}

¹Université de Bordeaux and ²Inserm, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, CIC1401, Bordeaux, France; ³Service d'Imagerie Thoracique et Cardiovasculaire, Service des Maladies Respiratoires, Service de Cardiologie, CIC1401, Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires, CHU de Bordeaux, Pessac, France; and ⁴Université de Bordeaux, Laboratoire Bordelais de Recherche en Informatique (LaBRI), Talence, France

Abstract

Rationale: Pulmonary hypertension (PH) is an established complication of advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) associated with increased mortality. The mechanisms coupling PH and bronchial obstruction are unknown; in particular, PH appears to be unrelated to emphysema. We hypothesized that computed tomographic (CT) measurement of airway remodeling instead of emphysema may correlate with PH in COPD.

Objectives: We aimed to describe the clinical and CT characteristics of patients with COPD with or without PH and to correlate CT measurements of airway remodeling and emphysema with PH.

Methods: Data were retrieved from 60 COPD patients who underwent both right heart catheterization and computed tomography in a period of stability and had no other disease known to cause PH. CT measurement of airway wall thickness (WT-Pi10) was used to assess airway remodeling and low lung area percentage (LAA%) to quantify emphysema extent.

Measurements and Main Results: Thirty-four of the sixty patients with COPD had PH (mean pulmonary arterial pressure [PAP_m] ≥ 25 mm Hg). There was no difference between the two groups regarding age, sex, and spirometric results, whereas there was more profound hypoxemia in the PH group. WT-Pi10 was increased in the patients with COPD and PH and correlated with PAP_m ($\rho = 0.62$; $P < 0.001$). Conversely, there was no difference or correlation between PAP_m and LAA% ($\rho = 0.12$; $P = 0.33$). In multivariate analysis ($R^2 = 0.53$), WT-Pi10 was the independent predictor most associated with PAP_m elevation, as compared to hypoxia (PaO₂) or pulmonary arterial enlargement (diameter ratio between the pulmonary arterial truncus and the ascending aorta).

Conclusions: This study demonstrates, for the first time to our knowledge, an association between structural alterations of bronchi and PH in COPD. Unlike quantification of emphysema, CT measurement of airway remodeling correlates with PAP_m and could be used to estimate the severity of PH in COPD. Airway remodeling burden is not limited to airflow limitation in the assessment of COPD severity and mortality.

Keywords: COPD; CT; pulmonary hypertension; remodeling

Pulmonary hypertension (PH) is an established complication of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (1) that has been demonstrated to be an independent risk factor for exacerbations

and death (2). Its prevalence depends on disease severity (3), and PH typically occurs in a subpopulation of patients with COPD with advanced disease, when airflow limitation is severe and/or associated with

hypoxia (4). Consequently, significant efforts have been undertaken to develop therapeutic strategies to relieve this critical cardiovascular complication, unfortunately with limited success so far (5). The

(Received in original form August 7, 2014; accepted in final form November 12, 2014)

Supported by the Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux.

Author contributions: G.D., F.L., and P.B.: conception and design; G.D., C.D., F.C., R.M., and P.B.: analysis and interpretation; G.D., R.M., F.L., and P.B.: drafting the manuscript for important intellectual content; G.D., P.-O.G., R.M., F.L., and P.B.: revising the manuscript for important intellectual content; G.D., C.D., F.C., M.M., E.B., F.P., F.B., P.-O.G., R.M., F.L., and P.B.: final approval of the manuscript.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to François Laurent, M.D., Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Inserm U1045, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: francois.laurent@chu-bordeaux.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 191, Iss 1, pp 63–70, Jan 1, 2015

Copyright © 2015 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201408-1423OC on November 13, 2014

Internet address: www.atsjournals.org

At a Glance Commentary

Scientific Knowledge on the

Subject: The relationship between bronchopulmonary remodeling and the development of pulmonary hypertension (PH) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is largely unknown. In particular, PH has been reported to be unrelated to emphysema. The association between PH and airway wall remodeling as measured on computed tomographic (CT) scans has not yet been assessed.

What This Study Adds to the

Field: Airway wall thickness measured on CT scans correlates with pulmonary arterial pressure and can estimate the degree of PH in COPD, whereas CT quantification of emphysema does not. The burden of airway remodeling is therefore not limited to airflow limitation in COPD severity and mortality. Airway remodeling is involved into complex interactions coupling the bronchopulmonary and cardiovascular systems that underlie the onset of PH in COPD.

results of recent clinical trials evaluating the effect of vasodilators have not shown improvement in PH severity, but instead have demonstrated aggravation in hypoxia and reduction in performance status (6–8).

Hence, there is a renewed interest in understanding the complex mechanisms underpinning development of PH in patients with COPD to better characterize those patients who may benefit from a specific PH treatment (9). It is admitted that PH in COPD is a secondary process in patients with primarily bronchopulmonary disorders. Although there is broad agreement on the role of hypoxia as a contributor to PH (10–12), there is surprisingly no evidence supporting the role of emphysema. Indeed, in both human and animal studies, no correlation has been found between pulmonary arterial pressure (PAP) and either quantification of emphysema extent (12–17) or loss of lung elastic recoil (18).

More detailed information about structural modifications is thus required to find a relationship, if any, between airway

obstruction, chronic lung inflammation, hypoxemia, and the development of PH. Because emphysema appears to be unrelated to PAP (13), we hypothesized that computed tomographic (CT) measurement of airway wall thickening may be associated with PH in patients with COPD. Indeed, airway remodeling and emphysema are the two main structural components of COPD. Though they share similar consequences of airflow limitation, it has been demonstrated that they develop independently from distinct pathophysiologic processes (19–24). On the one hand, proteolytic destruction of the lung parenchyma is associated with emphysema and loss of elastic properties. On the other hand, bronchial remodeling arises from fibrosis and/or chronic bronchial inflammation. Thus, the aims of the present study were (1) to describe the clinical and CT characteristics of patients with COPD with or without PH and (2) to correlate CT measurements of bronchial dimensions and emphysema with mean PAP (PAP_m). For comparison, we also assessed correlation of PAP_m with airflow limitation, hypoxemia, and pulmonary arterial enlargement, which have been reported to be associated with PH in COPD (11, 12, 25). Some of the results of our study have been accepted elsewhere in the form of an abstract (26).

Methods

Population Study

Data were retrieved from all consecutive patients with COPD older than 40 years of age who were referred to the tertiary unit of our institution between January 2010 and April 2014 for complete examination of chronic respiratory failure. The patients had to undergo a standardized panel of investigations within a maximum interval of 1 week, including physical examinations, pulmonary function tests (PFTs), arterial blood gas analyses, 6-minute walk tests, blood tests (antinuclear antibodies, HIV serology, and C-reactive protein [CRP]), transthoracic echocardiography, ventilation/perfusion scintigraphic scan, computed tomography, and right heart catheterization (RHC). The patients were clinically stable, i.e., they did not have a history of exacerbations within the 6 weeks prior to inclusion. For the purpose of our study, the inclusion criterion was a diagnosis

of COPD based on characteristic symptoms (e.g., dyspnea, cough, sputum production) associated with nonreversible airflow limitation on PFT confirmed by a post-bronchodilator FEV_1/FVC ratio < 0.70 . Exclusion criteria were the presence of at least one comorbidity associated with COPD known to cause PH, such as evidence of thromboembolic vessel occlusion on a ventilation/perfusion scintigraphic scan ($n = 3$), liver cirrhosis with portal hypertension ($n = 4$), a history of coronary disease and left ventricular ejection fraction less than 40% on an echocardiogram ($n = 15$), lung fibrosis ($n = 4$), and a family history of primary PH or use of anorexigen ($n = 0$). We also excluded patients who had presence of consolidation ($n = 1$), lung tumor ($n = 1$), and/or diffuse lung micronodules on CT scans ($n = 1$). PFTs were assessed by using body plethysmography (BodyBox, HypAir Compact; Medisoft, Sorinnes, Belgium). We used reference values give in the American Thoracic Society and European Respiratory Society guidelines (27, 28). CT scans of the chest were acquired at full inspiration on a SOMATOM Definition 64 (Siemens, Erlangen, Germany) (for details on the PFT, RHC, and CT protocols, see the METHODS section in the online supplement). PH was defined as $PAP_m \geq 25$ mm Hg assessed by RHC. The study was approved by the institutional review board at our institute.

Quantitative CT Analysis of Airways and Emphysema

Briefly, CT scans of the lung were anonymized, and full automatic analyses were performed in a blinded fashion from other patient data by one observer (FC) using dedicated, reproducible, validated software (29, 30) (for details, see supplemental METHODS). CT measurements were performed from the third to the fifth bronchi generation on an arbitrary set of four bronchial paths, starting from RB1, RB10, LB1, and LB10 (Boyden classification). Airway wall thickness of a standardized bronchus with an internal perimeter of 10 mm (WT-Pi10) was used to assess airway remodeling (31, 32). Additional spatially matched analyses of the plain wall thickness value (WT) (33) were assessed to get information on airway remodeling distribution (34, 35). Automatic quantification of emphysema was performed using Myrian software (Intrasense,

Montpellier, France). The percentage of low lung attenuation areas (LAA%) was derived from the voxel frequency distribution histogram and represented voxels less than a threshold value of -950 Hounsfield units. LAA% represents emphysema extent observed on CT scans (36).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using NCSS software (NCSS, Kaysville, UT). The results were expressed as means with standard deviations for continuous variables and absolute numbers for categorical variables. Comparisons were performed using a *t* test for continuous variables and a chi-square test for categorical variables. Repeated-measures analysis of variance was performed for multiple comparisons of bronchial paths. Correlations were assessed using Spearman's ρ coefficient. To determine the strength of the association found between PAP_m and variables found to correlate with PH in univariate analyses, we performed forward/backward multiple stepwise regression analyses with PAP_m as the dependent outcome. Variables highly cross-correlated were not entered in the model to determine the best model predictive of PAP_m (see supplemental METHODS).

Results

Characteristics of Study Population

A total of 60 patients with COPD met the inclusion and exclusion criteria. Demographic, respiratory function, biologic, and hemodynamic data of the study population are presented in Table 1. There was no difference between COPD patients with ($n = 34$) and those without PH ($n = 26$) regarding age, sex ratio, body mass index, tobacco consumption or dyspnea grade. The FEV₁ and transfer factor of the lung for carbon monoxide (TL_{CO}) were also not significantly different. TL_{CO} measurement was missing in five patients (three patients with PH, two patients without PH) who had breathing difficulties. Hypoxemia was more severe in patients with COPD and PH. The 6-minute walk test was completed by 32 of 34 patients with COPD with PH and by 23 of 26 patients with COPD without PH. The performance in patients with PH was lower than that in patients without PH. There was no significant difference in

Table 1. Patient Characteristics

Characteristics	COPD Patients without PH* (n = 26)	COPD Patients with PH* (n = 34)	P Values
Age, yr	58.7 ± 9.8	63.2 ± 11.9	0.12
Sex, male/female	18/8	26/8	0.52
Body mass index, kg/m ²	22.9 ± 4.2	24.1 ± 4.8	0.28
Tobacco consumption, pack-years	30.3 ± 25.1	29.8 ± 18.0	0.92
Dyspnea (NYHA class)	2.9 ± 0.6	3.1 ± 0.7	0.18
Respiratory function			
FEV ₁ , %	35.8 ± 20.3	39.1 ± 21.3	0.55
FEV ₁ /FVC	41.0 ± 13.7	45.1 ± 15.4	0.29
RV, %	213.0 ± 65.0	182.6 ± 77.8	0.11
TLC, %	127.8 ± 18.8	120.1 ± 17.3	0.10
TL _{CO} , %	37.3 ± 24.1	28.6 ± 13.5	0.09
Arterial blood gases (ambient air)			
PaO ₂ , mm Hg	67.4 ± 10.2	57.3 ± 8.8	<0.001 [†]
PaCO ₂ , mm Hg	43.9 ± 9.7	42.0 ± 8.3	0.40
6-min walk test (distance), m	389.8 ± 91.0	304.8 ± 113.8	0.005 [†]
Biology (C-reactive protein), mg/ml	5.9 ± 3.6	5.5 ± 3.8	0.69
Echocardiography (LVEF), %	61.8 ± 8.6	63.3 ± 6.6	0.45
RHC			
PAP _s , mm Hg	31.1 ± 6.0	46.2 ± 6.9	<0.001 [†]
PAP _m , mm Hg	20.1 ± 3.3	30.0 ± 3.9	<0.001 [†]
PAP _d , mm Hg	13.5 ± 3.9	19.2 ± 3.3	<0.001 [†]
Gradient, mm Hg	6.7 ± 2.9	11.6 ± 3.1	<0.001 [†]
PVR, Wood units	2.7 ± 1.1	4.6 ± 2.1	<0.001 [†]
PCWP, mm Hg	6.7 ± 3.1	7.5 ± 3.2	0.35
Cardiac index, L/min/m ²	2.9 ± 0.6	2.9 ± 0.6	0.72

Definition of abbreviations: COPD = chronic obstructive pulmonary disease; LVEF = left ventricular ejection fraction; NYHA = New York Heart Association; PAP_d = diastolic pulmonary arterial pressure; PAP_m = mean pulmonary arterial pressure; PAP_s = systolic pulmonary arterial pressure; PCWP = pulmonary capillary wedge pressure; PH = pulmonary hypertension; PVR = pulmonary vascular resistance; RHC = right heart catheterization; RV = residual volume; TLC = total lung capacity; TL_{CO} = transfer lung capacity of carbon monoxide.

Data are mean ± standard deviation for continuous variables and absolute number for categorical variables. Comparisons between groups were made using a *t* test for means and a chi-square test for ratios.

*PH was defined as PAP_m ≥ 25 mm Hg.

[†]*P* < 0.05.

left ventricular function as assessed by echocardiography. Estimates of systolic PAP were not available in 22 of 60 patients because of an insufficient window. All patients underwent RHC, and the PAP_m ranged from 13 to 38 mm Hg. All patients with COPD with PH had precapillary PH as assessed by a pulmonary capillary wedge pressure less than 15 mm Hg and a gradient higher than 10 mm Hg.

Relationship between PAP_m and Quantitative CT Parameters

Computed tomography-derived morphological parameters related to vessels, bronchi, and lung parenchyma were analyzed (Table 2). At the vascular level, the diameter ratio between the pulmonary

arterial truncus and the ascending aorta (AP/AO) was higher in patients with COPD with PH. At the bronchial level, the WT of a standardized bronchus with an internal perimeter of 10 mm (WT-Pi10) was significantly higher in patients with COPD with PH as compared with those without PH (Table 2). When we assessed each COPD population with and without PH separately, as well as the whole study population, we found that positive correlation coefficients between PAP_m and WT-Pi10 remained significant (Tables 3 and 4). Additional analyses of anatomically matched airways showed that the mean WT, assessed at the fourth and the fifth generation, was significantly higher in patients with COPD with PH as compared

Table 2. Comparison of Computed Tomography Parameters in Patients with COPD with or without PH

Parameters	COPD Patients without PH* (n = 26)		P Value
	PH* (n = 26)	COPD Patients with PH* (n = 34)	
Pulmonary artery (AP/AO)	0.84 ± 0.13	0.98 ± 0.15	<0.001 [†]
Airway remodeling (WT-Pi10)	3.69 ± 0.34	3.96 ± 0.30	0.002 [†]
Emphysema extent (LAA%)	20.41 ± 15.36	23.48 ± 14.34	0.42

Definition of abbreviations: AP/AO = diameter ratio between the pulmonary arterial truncus and the ascending aorta; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; LAA% = low lung attenuation area percentage; PH = pulmonary hypertension; WT-Pi10 = square root wall area of standardized bronchus with an internal perimeter of 10 mm.

Data are mean ± standard deviation. Comparisons between groups were made using the Student *t* test on means.

*PH was defined as PAP_m ≥ 25 mm Hg.

[†]P < 0.05.

with those without PH (see Table E1). By contrast, WT assessed at the third generation, as well as lumen areas (data not shown), were not different. In addition, there was no correlation between PAP_m and the mean WT measured at the segmental level (Figure 1A), whereas significant positive correlations were demonstrated between PAP_m and the mean WT measured at both the fourth generation (Figure 1B) and the fifth generation (Figure 1C). Similar correlations were found regardless of the bronchial path (Table E2). At the alveolar level, emphysema extent, assessed by LAA%, was not significantly different between the two groups of patients with COPD (Table 2), and there was no correlation between PAP_m and emphysema extent (Figure 1D).

Factors Influencing PAP_m

A correlation matrix between PAP_m and variables thought to be associated with PH is presented in Table 4, including PFTs, vascular biomarkers (AP/AO), emphysema (LAA%), and bronchial remodeling

(WT-Pi10). WT-Pi10 showed correlations with PAP_m, TLCO%, PaO₂, and AP/AO. LAA% correlated with FEV₁% and TLCO%. Other variables, such as PaO₂, TLCO%, and AP/AO, correlated with PAP_m. For each COPD patient subgroup, WT-Pi10 was the sole independent predictor correlated with PAP_m (Tables E3 and E4).

Significant variables were entered into stepwise multiple regression analyses to determine both the best model and the strength of each individual parameter to predict PAP_m. For all 60 patients with COPD, the best model associated the biomarkers WT-Pi10, PaO₂, and AP/AO and explained 53% (R² = 0.53) of the variation in this measurement (Table 5). However, WT-Pi10 explained 19% of the variation, whereas PaO₂ explained 5% and AP/AO 3% only. In patients with COPD with PH, the best model associated the biomarkers WT-Pi10, FEV₁%, and AP/AO and explained 51% (R² = 0.51) (Table 5). For those patients, WT-Pi10 explained 28%, whereas FEV₁% explained 8% and AP/AO 7% only. In patients with COPD

without PH, WT-Pi10 was the sole independent predictor and explained 56% (R² = 0.56) of the variation (Table 5).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report that points out a relationship between bronchi remodeling and PAP in patients with COPD. To date, quantitative CT measurement of airway dimensions has received far less attention than emphysema as a predictor of the onset of COPD-associated PH. In the present study, multivariate analyses indicate that increased WT is the factor most associated with PAP_m elevation, as compared with airflow limitation, hypoxia, or CT measurement of pulmonary arterial enlargement. In contrast, as previously reported, we confirm, using a full automatic quantification technique, that there is no correlation between emphysema extent and PAP.

Bronchial wall thickening in COPD corresponds to structural modifications observed on pathological examinations, including hypertrophy and hyperplasia of parietal glands, enlargement of goblet cells, mucous production, and chronic inflammation (37, 38). Though airway obstruction predominantly involves distal airways (21), a recent study by Nakano and colleagues demonstrated that bronchial thickening measured by computed tomography on proximal bronchi correlates with bronchiolar dimensions measured on histological specimens (20). These results support those described in a report by Tiddens and colleagues, who showed that WT of cartilaginous bronchi is related to small airway obstruction and inflammation (39). In the present study, we found an increasing correlation between WT and PAP_m from the third to the fifth generation, confirming that small-sized airways are more likely than large-sized airways to be involved in COPD functional impairment. This finding appears to be in agreement with a previous classical description by Burrows and colleagues, who reported that patients with COPD subjects with prominent bronchial disease, i.e., the so-called “blue-boater” phenotype, are more likely than those with the emphysematous “pink-puffer” phenotype to develop pronounced hypoxemia (40) and consequently PH. Biernacki and colleagues

Table 3. Correlations of PAP_m with CT Measurements of Wall Thickness and Emphysema in Patients with COPD with or without PH

Variables	COPD Patients without PH* (n = 26)		COPD Patients with PH* (n = 34)	
	ρ	P Values	ρ	P Values
Airway remodeling (WT-Pi10)	0.60	0.001 [†]	0.61	<0.001 [†]
Emphysema extent (LAA%)	0.28	0.16	-0.14	0.42

Definition of abbreviations: COPD = chronic obstructive pulmonary disease; LAA% = low lung attenuation area percentage; PAP_m = mean pulmonary arterial pressure; PH = pulmonary hypertension; WT-Pi10 = square root wall area of standardized bronchus with an internal perimeter of 10 mm.

Data are Spearman's ρ correlation coefficients.

*PH was defined as PAP_m ≥ 25 mm Hg.

[†]P < 0.05.

Table 4. Correlation Matrix between PAP_m, Respiratory Function, and CT Parameters in 60 Patients with COPD

Parameters	PAP _m	FEV ₁ %	TL _{CO} %	PaO ₂	AP/AO	LAA%
FEV ₁ %	-0.02 (0.89)					
TL _{CO} %	-0.38* (0.004)	0.27* (0.04)				
PaO ₂	-0.51* (<0.001)	-0.01 (0.91)	0.18 (0.18)			
AP/AO	0.48* (<0.001)	-0.02 (0.88)	-0.16 (0.23)	-0.47* (<0.001)		
LAA%	0.12 (0.33)	-0.40* (<0.001)	-0.32* (0.02)	0.11 (0.39)	0.12 (0.38)	
WT-Pi10	0.62* (<0.001)	-0.20 (0.13)	-0.41* (0.002)	-0.31* (0.02)	0.35* (0.006)	0.24 (0.06)

Definition of abbreviations: AP/AO = diameter ratio between the pulmonary arterial truncus and the ascending aorta; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; LAA% = low lung attenuation area percentage; PAP_m = mean pulmonary arterial pressure; TL_{CO} = transfer lung capacity of carbon monoxide; WT-Pi10 = square root wall area of standardized bronchus with an internal perimeter of 10 mm.

Data are Spearman's ρ correlation coefficients, and data in parentheses are the associated *P* values.

**P* < 0.05.

further showed that emphysema does not correlate with hypoxia or PH and cannot discriminate blue-boaters from pink-puffers (12). However, bronchial dimensions were not assessed in their study. More recently, the COPDGene cohort showed that CT measurement of bronchial dimensions is increased in patients with COPD with chronic bronchitis, whereas patients with chronic bronchitis and those without it had similar levels of emphysema (28). However, patients in the COPDGene study were not hemodynamically characterized. In contrast, the present study was performed in patients with COPD with extensive hemodynamic characterization. A detailed analysis of both bronchi and lung parenchyma was performed using full automatic, validated, reproducible software (21, 22) that enabled us to demonstrate that CT features of bronchial thickening rather than parenchymal destruction relate to PH in patients with COPD.

Nevertheless, it has previously been pointed out that gas exchange alteration cannot be considered the sole contributor to PH in patients with COPD. In a study by Scharf and colleagues, there was a correlation between PaO₂ and PAP_m in univariate analysis, but not in multivariate analysis (12). Moreover, Kessler and colleagues have shown that hypoxic vasoconstriction plays a minor role when PaO₂ is higher than 60 mm Hg (2). In addition, vessel modification in COPD with PH is thought to be mediated by an inflammatory process secondary to cigarette smoke exposure. In this connection, pathological examination revealed an association between thickening of the intima and both endothelial

dysfunction and CD8⁺ T cell infiltration (41). In a murine model of COPD, Kang and colleagues showed that cytokines, such as IL-17 and IL-13, induce bronchial wall fibrosis and mucous metaplasia (42). The same mediators were found to promote pulmonary vascular remodeling and to counteract emphysema. Additional data supporting the role of inflammation to generate PH in humans are derived from

studies relating PAP_m to blood CRP levels, tumor necrosis factor α (43), or IL-6 (17). Increased levels of vascular endothelial growth factor, both in lung tissue (44) and in sputum (45), have been found in patients with chronic bronchitis. Moreover, vascular endothelial growth factor in sputum correlates with PAP_m, and this sputum measurement was considered a noninvasive biomarker of pulmonary

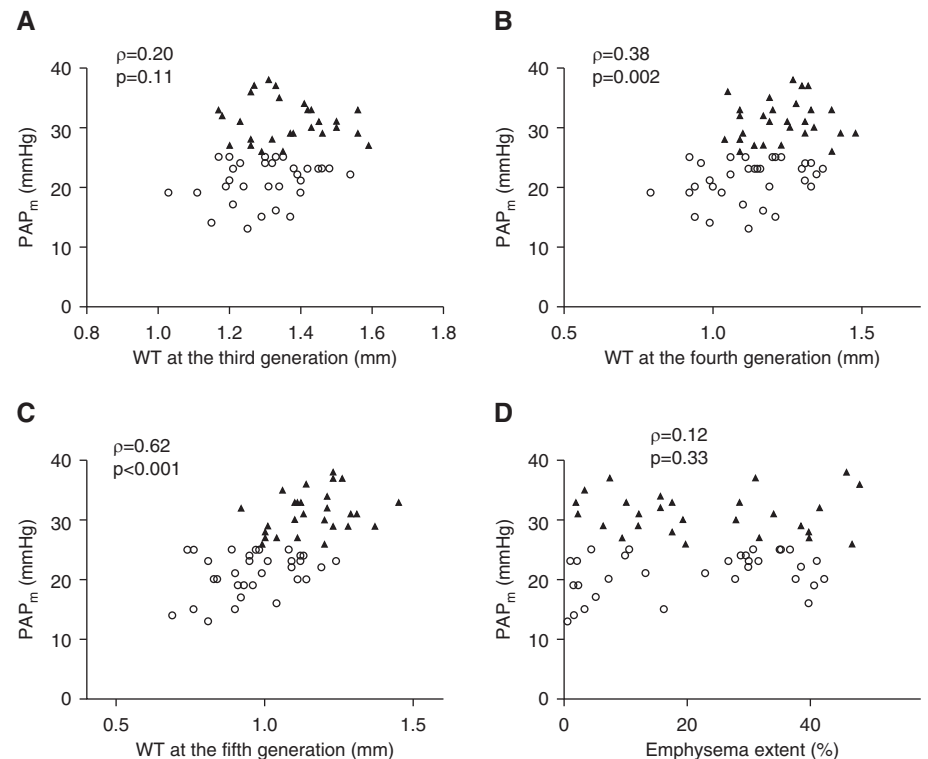


Figure 1. Spatially matched correlations between mean pulmonary arterial pressure (PAP_m), wall thickness (WT) assessed per bronchial generation, and emphysema using computed tomography. *White circles:* patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and without pulmonary hypertension (PH); *black triangles:* patients with COPD and PH.

Table 5. Determinants of PAP_m in Patients with COPD with or without PH

Population Studied	Best Model	Independent Variables	Standardized β	Partial R^2	P Value
All COPD patients ($n = 60$)	$R^2 = 0.53$; $P < 0.001$ F -ratio = 20.6 MSE = 18.3	WT-Pi10	8.4	0.19	<0.001
		PaO ₂	-0.15	0.05	0.01
		AP/AO	7.2	0.03	0.08
COPD patients with PH ($n = 34$)	$R^2 = 0.51$; $P < 0.001$ F -ratio = 10.4 MSE = 7.3	WT-Pi10	6.6	0.28	<0.001
		FEV ₁ %	-0.05	0.08	0.03
		AP/AO	6.6	0.07	0.050
COPD patients without PH ($n = 26$)	$R^2 = 0.56$; $P < 0.001$ F -ratio = 31.2 MSE = 3.7	WT-Pi10	6.8	0.56	<0.001

Definition of abbreviations: AP/AO = diameter ratio between the pulmonary arterial truncus and the ascending aorta; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; MSE = mean square error; PH = pulmonary hypertension; WT-Pi10 = square root wall area of a standardized bronchus with an internal perimeter of 10 mm.

vascular remodeling. It is noteworthy that we included clinically stable patients only, and we found that there was no difference or correlation with CRP concentration (data not shown). Therefore, it cannot be ruled out that the relationship between bronchi and PAP_m may also result from irreversible changes due to chronic lung inflammation and repairing of the bronchial wall. Whether the molecular mechanisms responsible for airway remodeling may share pathways and/or genetic susceptibility with those implicated in pulmonary vascular remodeling deserves further study.

Recently, it was emphasized that patients with COPD with bronchial disease develop pejorative outcomes with increased risk for hospitalization (46) and exacerbation (33). Our results further unravel that these patients are also at high risk of developing PH. Beyond FEV₁% and PaO₂, WT may allow for classification of a distinct prognostic subgroup for more targeted medical management and research purposes (47). Moreover, recent clinical trials have demonstrated that molecules with proven benefit in idiopathic pulmonary arterial hypertension fail at improving PH secondary to COPD (6–8). WT-Pi10 was found to be the predictor most associated with PAP_m elevation and may indicate that specific bronchovascular interactions should be taken into account. In future clinical trials, computed tomography may be an effective tool for characterizing more homogeneous subgroups of patients with COPD to better understand which ones may benefit from a specific PH treatment.

Similarly to previous studies by other investigators, we did not find a correlation between CT measurement of emphysema extent and PAP_m (10, 12–14, 16–18). Some previous studies were performed either in COPD patients unselected for emphysema degree (13, 17) or in selected patients affected with severe emphysema (12, 14, 16, 18) or severe PH (10). In the present study, we included patients with emphysema of a wide range of severity. Moreover, we performed a full automatic quantification of emphysema using dedicated software with a validated threshold of -950 Hounsfield units (36). Despite these differences in study design, our results support the hypothesis that the parenchymal destruction extent observed on CT scans does not play a major role in resting pulmonary hemodynamic disorders. The compression of vasculature by lung hyperinflation may have an effect during exercise, but this hypothesis has not been confirmed yet; for example, the National Emphysema Treatment Trial showed no correlation between PH and loss of lung elastic recoil (18).

The present study has several limitations that deserve comment. The design is observational; one thus cannot draw conclusions about a causal link between increased bronchial dimensions on CT scans and PAP_m increases. In addition, the study population was small and restricted to patients referred to a tertiary unit, and there were no control subjects. Thus, the presence of PH in more than 50% of our study population cannot be considered as indicative of the general prevalence of PH in patients with COPD,

but it is in the range of those reported by researchers at other tertiary units (10–12, 25). Nevertheless, Wells and colleagues have recently shown that 31% of a large COPD population (819 of 2,645 patients) had both pulmonary arterial enlargement on CT scans (AP/AO > 1) and increased bronchial thickening (48). The same team also showed that a single measurement of AP/AO can predict COPD with PH (25). Our results may indicate that, using relevant information related to vessels (AP/AO), bronchi (WT-Pi10), and hypoxia (PaO₂), a multivariate model can improve this alternative strategy to estimate PAP_m noninvasively ($R^2 = 0.53$). However, future prospective evaluations, including a comparison with echocardiography, other CT parameters reported to predict PAP_m (16), or magnetic resonance imaging (49) are needed in a large population.

Finally, our results give evidence that, in COPD, bronchi are involved in complex processes coupling the bronchopulmonary and cardiovascular systems. Unlike CT quantification of emphysema, airway WT correlates to PAP_m and could be used to estimate PAP noninvasively. This may provide further understanding of the burden of airway remodeling to explain COPD severity and mortality, which are not limited to functional consequences on airflow limitation. Specifically, our study suggests a critical contribution of airway remodeling to explain PH in COPD at the fringe of bronchial obstruction, gas exchange, and chronic lung inflammation. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

References

- Minai OA, Chaouat A, Adnot S. Pulmonary hypertension in COPD: epidemiology, significance, and management: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 2010; 137(6 Suppl):39S–51S.
- Kessler R, Faller M, Weitzenblum E, Chaouat A, Aykut A, Ducoloné A, Ehrhart M, Oswald-Mammosser M. “Natural history” of pulmonary hypertension in a series of 131 patients with chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:219–224.
- Seeger W, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galiè N, Ghio S, Gibbs S, et al. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(25 Suppl): D109–D116.
- Chaouat A, Naeije R, Weitzenblum E. Pulmonary hypertension in COPD. *Eur Respir J* 2008;32:1371–1385.
- Humbert M, Simonneau G. Vasodilators in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension: not ready for prime time! *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181: 202–203.
- Blanco I, Santos S, Gea J, Güell R, Torres F, Gimeno-Santos E, Rodríguez DA, Vilaró J, Gómez B, Roca J, et al. Sildenafil to improve respiratory rehabilitation outcomes in COPD: a controlled trial. *Eur Respir J* 2013;42:982–992.
- Stolz D, Rasch H, Linka A, Di Valentino M, Meyer A, Brutsche M, Tamm M. A randomised, controlled trial of bosentan in severe COPD. *Eur Respir J* 2008;32:619–628.
- Goudie AR, Lipworth BJ, Hopkinson PJ, Wei L, Struthers AD. Tadalafil in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med* 2014;2:293–300.
- Wrobel JP, Thompson BR, Williams TJ. Mechanisms of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: a pathophysiologic review. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:557–564.
- Chaouat A, Bugnet AS, Kadaoui N, Schott R, Enache I, Ducoloné A, Ehrhart M, Kessler R, Weitzenblum E. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:189–194.
- Thabut G, Dauriat G, Stern JB, Logeart D, Lévy A, Marrash-Chahla R, Mal H. Pulmonary hemodynamics in advanced COPD candidates for lung volume reduction surgery or lung transplantation. *Chest* 2005;127:1531–1536.
- Scharf SM, Iqbal M, Keller C, Criner G, Lee S, Fessler HE; National Emphysema Treatment Trial (NETT) Group. Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:314–322.
- Biemacki W, Gould GA, Whyte KF, Flenley DC. Pulmonary hemodynamics, gas exchange, and the severity of emphysema as assessed by quantitative CT scan in chronic bronchitis and emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1509–1515.
- Criner GJ, Scharf SM, Falk JA, Gaughan JP, Sternberg AL, Patel NB, Fessler HE, Minai OA, Fishman AP; National Emphysema Treatment Trial Research Group. Effect of lung volume reduction surgery on resting pulmonary hemodynamics in severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:253–260.
- Wright JL, Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med* 2010;4: 723–734.
- Matsuoka S, Washko GR, Yamashiro T, Estepar RS, Diaz A, Silverman EK, Hoffman E, Fessler HE, Criner GJ, Marchetti N, et al.; National Emphysema Treatment Trial Research Group. Pulmonary hypertension and computed tomography measurement of small pulmonary vessels in severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:218–225.
- Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, Maitre B, Housset B, Brandt C, Le Corvoisier P, et al. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest* 2009;136:678–687.
- Falk JA, Martin UJ, Scharf S, Criner GJ. Lung elastic recoil does not correlate with pulmonary hemodynamics in severe emphysema. *Chest* 2007;132:1476–1484.
- Nakano Y, Muro S, Sakai H, Hirai T, Chin K, Tsukino M, Nishimura K, Itoh H, Paré PD, Hogg JC, et al. Computed tomographic measurements of airway dimensions and emphysema in smokers: correlation with lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162: 1102–1108.
- Nakano Y, Wong JC, de Jong PA, Buzatu L, Nagao T, Coxson HO, Elliott WM, Hogg JC, Paré PD. The prediction of small airway dimensions using computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:142–146.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645–2653.
- Patel BD, Coxson HO, Pillai SG, Agustí AG, Calverley PM, Donner CF, Make BJ, Müller NL, Rennard SI, Vestbo J, et al.; International COPD Genetics Network. Airway wall thickening and emphysema show independent familial aggregation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:500–505.
- Coxson HO, Leipsic J, Parraga G, Sin DD. Using pulmonary imaging to move chronic obstructive pulmonary disease beyond FEV₁. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:135–144.
- Gosselink JV, Hayashi S, Elliott WM, Xing L, Chan B, Yang L, Wright C, Sin D, Paré PD, Pierce JA, et al. Differential expression of tissue repair genes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1329–1335.
- Iyer AS, Wells JM, Vishin S, Bhatt SP, Wille KM, Dransfield MT. CT scan-measured pulmonary artery to aorta ratio and echocardiography for detecting pulmonary hypertension in severe COPD. *Chest* 2014;145:824–832.
- Dournes G, Laurent F, Coste F, Dromer C, Blanchard E, Picard F, Baldacci F, Montaudon M, Girodet PO, Marthan R, et al. CT measurement of airway wall thickness in emphysema in COPD: correlation with pulmonary hypertension [in French] [abstract]. *Rev Mal Respir (In press)*
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, et al.; ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319–338.
- Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005;26:511–522.
- Montaudon M, Berger P, de Dietrich G, Braquelaire A, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Laurent F. Assessment of airways with three-dimensional quantitative thin-section CT: in vitro and in vivo validation. *Radiology* 2007;242:563–572.
- Berger P, Perot V, Desbarats P, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Laurent F. Airway wall thickness in cigarette smokers: quantitative thin-section CT assessment. *Radiology* 2005;235:1055–1064.
- Johannessen A, Skorge TD, Böttai M, Grydeland TB, Nilsen RM, Coxson H, Dirksen A, Omenaas E, Gulsvik A, Bakke P. Mortality by level of emphysema and airway wall thickness. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:602–608.
- Grydeland TB, Dirksen A, Coxson HO, Eagan TM, Thorsen E, Pillai SG, Sharma S, Eide GE, Gulsvik A, Bakke PS. Quantitative computed tomography measures of emphysema and airway wall thickness are related to respiratory symptoms. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:353–359.
- Han MK, Kazerooni EA, Lynch DA, Liu LX, Murray S, Curtis JL, Criner GJ, Kim V, Bowler RP, Hanania NA, et al.; COPDGene Investigators. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbations in the COPDGene study: associated radiologic phenotypes. *Radiology* 2011;261:274–282.
- Hasegawa M, Nasuhara Y, Onodera Y, Makita H, Nagai K, Fuke S, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Airflow limitation and airway dimensions in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1309–1315.
- Smith BM, Hoffman EA, Rennard S, Barr RG. Location, location, location: studying anatomically comparable airways is highly relevant to understanding COPD. *Thorax* 2014;69:1049–1050.
- Matsuoka S, Yamashiro T, Washko GR, Kurihara Y, Nakajima Y, Hatabu H. Quantitative CT assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Radiographics* 2010;30:55–66.

37. Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, Boschetto P, Fabbri LM, Saetta M. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:629–632.
38. O’Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV₁. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:852–857.
39. Tiddens HA, Paré PD, Hogg JC, Hop WC, Lambert R, de Jongste JC. Cartilaginous airway dimensions and airflow obstruction in human lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:260–266.
40. Burrows B, Fletcher CM, Heard BE, Jones NL, Wootliff JS. The emphysematous and bronchial types of chronic airways obstruction: a clinicopathological study of patients in London and Chicago. *Lancet* 1966;1:830–835.
41. Peinado VI, Barberá JA, Abate P, Ramírez J, Roca J, Santos S, Rodríguez-Roisin R. Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1605–1611.
42. Kang MJ, Choi JM, Kim BH, Lee CM, Cho WK, Choe G, Kim DH, Lee CG, Elias JA. IL-18 induces emphysema and airway and vascular remodeling via IFN- γ , IL-17A, and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1205–1217.
43. Joppa P, Petrasova D, Stancak B, Tkacova R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest* 2006;130:326–333.
44. Lee SH, Lee SH, Kim CH, Yang KS, Lee EJ, Min KH, Hur GY, Lee SH, Lee SY, Kim JH, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1 α in lung tissue of patients with chronic bronchitis. *Clin Biochem* 2014;47:552–559.
45. Kanazawa H, Asai K, Nomura S. Vascular endothelial growth factor as a non-invasive marker of pulmonary vascular remodeling in patients with bronchitis-type of COPD. *Respir Res* 2007;8:22.
46. Kim V, Criner GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:228–237.
47. Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, Macnee W, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:598–604.
48. Wells JM, Washko GR, Han MK, Abbas N, Nath H, Mamary AJ, Regan E, Bailey WC, Martinez FJ, Westfall E, et al.; COPD Gene Investigators; ECLIPSE Study Investigators. Pulmonary arterial enlargement and acute exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2012;367:913–921.
49. Rahaghi FN, van Beek EJ, Washko GR. Cardiopulmonary coupling in chronic obstructive pulmonary disease: the role of imaging. *J Thorac Imaging* 2014;29:80–91.

Publication n°2

« CT evaluation of small pulmonary vessels area in patients

with COPD with severe pulmonary hypertension »

Florence Coste, Gaël Dournes, Claire Dromer, Elodie Blanchard,
Véronique Freund-Michel, Pierre-Olivier Girodet, Michel Montaudon,
Fabien Baldacci, François Picard, Roger Marthan, Patrick Berger et François Laurent

Thorax 2016 ; 191 (1) : 63-70

Alors que beaucoup d'études par tomodensitométrie ont été réalisées sur les voies aériennes proximales et distales dans les maladies touchant le poumon, peu d'études utilisant cette technique ont porté sur l'altération des petits vaisseaux dans l'hypertension pulmonaire (HTP). L'HTP, qui est une complication connue de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), est généralement modérée. Toutefois, l'HTP sévère (HTPs), avec une PAPm supérieure à 35 mmHg, est rarement observée chez les patients atteints de BPCO. Les causes de cette sévérité ne sont, à l'heure actuelle, pas connues. L'hypothèse d'un phénotype distinct a été émise dans la littérature. Ce phénotype serait davantage lié à une altération vasculaire qu'à une altération des fonctions respiratoires. Dans cette étude, nous avons cherché à savoir si l'étude quantitative des petits vaisseaux par tomodensitométrie, pouvait permettre de reconnaître *in vivo* l'HTPs chez les patients atteints de BPCO.

Notre étude rétrospective a permis d'inclure 105 patients atteints de BPCO qui avaient effectué des explorations fonctionnelles respiratoires, un scanner et un cathétérisme cardiaque droit pendant une période de stabilité. A partir de ces 105 patients, 20 patients avec une BPCO associée à une HTPs ont été comparés et appariés avec 20 patients atteints de BPCO avec ou sans HTP modérée. Le pourcentage des petits vaisseaux pulmonaires de 5 mm² ou de 5-10 mm² normalisé par la surface pulmonaire (%CSA), le nombre d'intersections de vaisseaux et l'épaisseur de la paroi bronchique ont été évalués par tomodensitométrie, puis comparés entre les deux groupes. Des scores, appelés « Paw scores », combinant la mesure de la PaO₂ et les paramètres scannographiques les mieux corrélés à la PAPm (pourcentage de petits vaisseaux et épaisseur de la paroi bronchique), ont été comparés par analyse ROC

(« receiver operating characteristic ») afin de prédire la présence d'HTPs chez les patients atteints de BPCO.

Nos résultats montrent que les valeurs de nombre et de pourcentage de surface de petits vaisseaux pulmonaires sont statistiquement plus grandes chez les patients atteints de BPCO associée à une HTPs que chez les patients atteints de BPCO sans HTPs. Une analyse multivariée a permis de démontrer que les paramètres pouvant le mieux expliquer les variations de PAPm étaient différents selon les groupes : il s'agit du pourcentage de surface des petits vaisseaux pour le groupe de patients BPCO avec HTPs, alors que c'est l'épaisseur de la paroi bronchique pour le groupe de patients BPCO sans HTPs. Le « Paw score », combinant PaO₂, pourcentage de surface des petits vaisseaux pulmonaires et épaisseur de la paroi bronchique, a permis de prédire la présence d'une HTPs chez des patients atteints de BPCO.

En conclusion, l'étude des petits vaisseaux pulmonaires par tomодensitométrie a permis de confirmer l'existence d'un phénotype de BPCO particulier, causé par l'altération des vaisseaux et entraînant une HTPs. Le score utilisé est donc un outil non-invasif intéressant, permettant de sélectionner les patients devant subir un cathétérisme cardiaque droit.

<http://thorax.bmj.com/content/early/2016/04/15/thoraxjnl-2015-207696.long>

ORIGINAL ARTICLE

CT evaluation of small pulmonary vessels area in patients with COPD with severe pulmonary hypertension

Florence Coste,^{1,2,3} Gaël Dournes,^{1,2,3} Claire Dromer,³ Elodie Blanchard,³ Véronique Freund-Michel,^{1,2} Pierre-Olivier Girodet,^{1,2,3} Michel Montaudon,^{1,2,3} Fabien Baldacci,⁴ François Picard,³ Roger Marthan,^{1,2,3} Patrick Berger,^{1,2,3} François Laurent^{1,2,3}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207696>).

¹Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, Bordeaux, France

²Inserm, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, CIC1401, Bordeaux, France

³CHU de Bordeaux, Service d'Imagerie Thoracique et Cardiovasculaire, Service des Maladies Respiratoires, Service de Cardiologie, CIC1401, Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires, Pessac, France

⁴LaBRI, Univ. Bordeaux, Talence, France

Correspondence to

Professor François Laurent, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, Université Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, Cedex 33076, France; francois.laurent@chu-bordeaux.fr

FC and GD equal contribution (co-first author)

PB and FL equal contribution (co-last author)

Received 13 August 2015

Revised 26 February 2016

Accepted 15 March 2016

ABSTRACT

Rationale Severe pulmonary hypertension (PH) is very uncommon in COPD, and a distinct phenotype has been hypothesised. We aimed to evaluate whether CT can help to recognise this condition non-invasively by measuring small pulmonary vessels.

Material and methods Patients with COPD who underwent pulmonary function tests, unenhanced CT of the chest and right heart catheterisation (RHC) during a period of stability were included in the study. From 105 included patients, 20 patients with COPD with severe PH (mean pulmonary arterial pressure, mPAP>35 mm Hg) were compared with 20 FEV₁-matched and age-matched patients with COPD with mild or without PH (mPAP<35 mm Hg). The percentage of total cross-sectional area of vessels less than 5 mm² normalised by lung area (%CSA_{<5}) and 5–10 mm² (%CSA_{5–10}), the mean number of cross-sectioned vessels (CSNs) and bronchial wall thickness (WT) were measured on CT examination and compared between groups. Paw scores combining PaO₂ measurement and CT parameters best correlated with mPAP were compared by receiver operating characteristic analysis to predict severe PH in COPD.

Results Patients with severe PH COPD had higher %CSA and CSN values than those of patients with COPD without severe PH. Using multiple regression analysis, %CSA_{<5} and WT were the best predictors of mPAP in patients with and without severe PH, respectively. A score combining %CSA_{<5}, PaO₂ and WT best predicted severe PH in patients with COPD.

Conclusions CT measurements of small vessels support a distinct vessel-related phenotype in patients with COPD with severe PH, and combined with WT and PaO₂ parameters in the paw score, which may offer a non-invasive tool to select patients for RHC.

INTRODUCTION

The development of pulmonary hypertension (PH) in COPD is associated with poor prognosis on mortality and quality of life.¹ An increase of 10 mm Hg in mean pulmonary arterial pressure (mPAP) increases mortality by more than fourfold.² Most of the time, PH in COPD remains mild to moderate. However, a small proportion of patients develop severe PH, which has been defined by

Key messages

What is the key question?

► In a population of patients with COPD, are in vivo morphometric changes of the vascular bed observed by CT able to predict severe pulmonary hypertension?

What is the bottom line?

► To date, no study has reported in vivo assessment of pulmonary vessels in a very uncommon COPD phenotype associated with severe pulmonary hypertension, and a non-invasive tool for better characterising this population might be useful.

Why read on?

► CT measurements of small vessels support a distinct vessel-related phenotype in patients with COPD with severe pulmonary hypertension, and combined with wall thickness and PaO₂ parameters in the paw score, which may offer a non-invasive tool to select patients for right heart catheterisation or for non-invasive follow-up in longitudinal study.

mPAP higher than 35 mm Hg.³ Therefore, severe PH is very uncommon in patients with COPD,^{3–6} ranging from 5% to 13%,^{4,7} and prone to display severe hypoxaemia, hypocapnia and decrease in carbon oxide diffusing capacity.⁵ Though PH in COPD is classified by the WHO in group 3^{3,8,9} (ie, PH associated with lung disease and/or hypoxia), the development of severe PH in some patients with COPD has been supposed to involve a distinct phenotype related to vessels rather than airways.¹⁰ CT of the chest has long been used to study non-invasively chronic obstructive diseases. Quantification of bronchi wall areas (WAs) and voxel attenuation of parenchyma has been demonstrated to correlate with airway remodelling and emphysema, respectively.^{11,12} Very recently, we demonstrated a close relationship between pulmonary arterial pressure and bronchial wall thickening, but the vast majority of patients did not present severe PH.¹³ Although there is a

To cite: Coste F, Dournes G, Dromer C, *et al.* *Thorax* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207696



Pulmonary vasculature

paramount literature around quantitative CT of airways in COPD, few data have been reported to quantitative CT of small pulmonary vessels.^{14–17} A single study aimed at evaluating CT assessment of small vessels in COPD subjects with PH and severe emphysema.¹⁶ In that study, the degree of mPAP did not exceed the threshold of 40 mm Hg, so data from CT examinations that could support a distinct vessel alteration among COPD subjects with severe PH are still lacking. We aimed at evaluating whether CT can provide *in vivo* evidence about changes of the vascular bed in a population of patients with COPD with severe PH, in order to select patients for right heart catheterisation. For this purpose, we compared the pulmonary function tests (PFTs), CT parameters and mPAP by right heart catheterisation between COPD populations with and without severe PH. Then, we finally aimed to predict the presence of severe PH in patients with COPD using combined score. Preliminary results of this study have been presented in the form of abstracts.^{18–20}

MATERIAL AND METHODS

Study population

Patients with COPD were referred between January 2008 and December 2014 to our institution, a tertiary medical centre for complete examination of PH, before initiation of any treatment. All patients underwent within 1 week: medical questioning, physical examination, 6-minute walk tests (6-MWTs), arterial blood gases, blood tests (including C-reactive protein (CRP), antinuclear antibodies and HIV serology), PFT, transthoracic echocardiography, ventilation/perfusion scintigraphy (V/Q scan), right heart catheterisation (RHC), and unenhanced CT within a minimal period of 1 month of disease stability.

Body plethysmography (BodyBox, Medisoft, Belgium) was used to perform PFT. We chose reference values from the American Thoracic Society²¹ and the European Respiratory Society guidelines.²²

CT scans were performed on a Somatom Sensation Definition 64 (Siemens, Erlangen, Germany) at full inspiration. Quantitative analysis was performed by using dedicated and validated softwares.^{23 24} Automatic quantification of bronchi WA, lumen area, WA per cent (WA%) and wall thickness (WT) was obtained on orthogonal bronchial cross sections by using the Laplacian-of-Gaussian algorithm and homemade software.^{24 25} Automatic quantification of emphysema was assessed with Myrian software (Intrasense, Montpellier, France) using low attenuation area per cent (LAA%), as previously described.¹³

Automated measurement of small vessel area from CT images was obtained by using the Image J software V.1.40g (a public domain Java image programme available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), method detailed elsewhere.^{14–16} The following measurements were obtained: the cross-sectional area of small pulmonary vessel less than 5 mm² (%CSA_{<5}), and between 5 and 10 mm² (%CSA_{5–10}), the mean number of cross-sectioned vessels CSN_{<5} and CSN_{5–10} normalised by the corresponding lung section area at each CT slice (figure 1). Manual measurements of large vessels were performed on multiplanar reconstruction strictly orthogonal to the main axis of the pulmonary arterial troncus (AP) and the ascending aorta (AO).

Statistical analysis

NCSS software (NCSS 2001, Kaysville, Utah, USA) was used to assess statistical analyses. *p* Values <0.05 were considered significant. Results were expressed as mean with SD. Comparisons

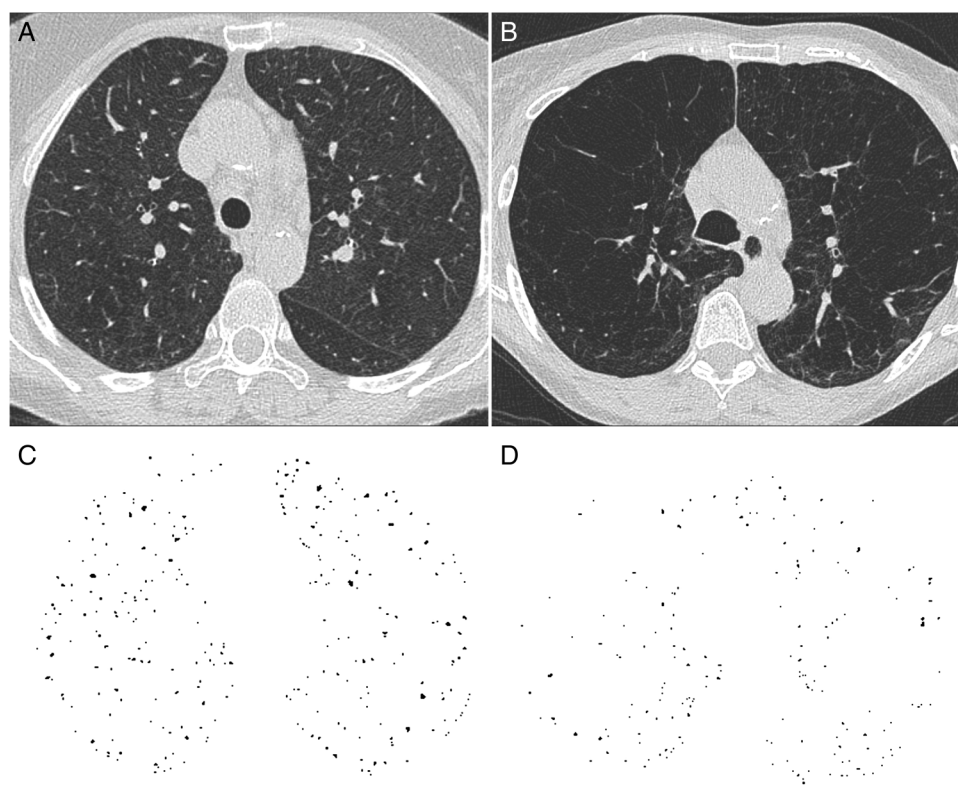


Figure 1 Native isolated CT sections of two representative patients with COPD with (A) and without (B) severe PH. After thresholding and conversion into binary image, a mask was applied to analyse only circular particle ranging from 0 to 5 mm², (C and D) representing the corresponding postprocessing CT sections, respectively. Note that the number of small vessel sections is visually different in both subjects.

Table 1 Variables and range used for computation of the paw score standardisation using quartile range

Variables	Points on paw score			
	0	1	2	3
PaO ₂ (mm Hg)	≥64.5	(51.5–64.4)	(46.5–51.4)	<46.5
%CSA _{<5}	<0.313	(0.313–0.432)	(0.433–0.547)	≥0.548
WT	<1.095	(1.095–1.179)	(1.180–1.324)	≥1.325

WT, mean wall thickness; %CSA_{<5}, percentage of total lung area taken up by the cross-sectional area of pulmonary vessels less than 5 mm².

were performed by using t tests. Parameters that were not normally distributed were expressed as median with IQRs and analysed by Mann–Whitney tests. Categorical variables were tested with Fisher's exact tests. Univariate correlations were assessed using Pearson product–moment coefficients. Identification of the strength of the association between mPAP and other variables was assessed using forward stepwise multiple regression analyses. To predict severe PH, we built four scores (ie, paw scores), combining two to three variables, best correlated to mPAP; the higher value indicating a higher risk of severe PH (table 1). Scores were compared by using areas under the curve (AUCs) of receiver operating characteristic (ROC) curves.

For details about PFT, RHC, CT protocols or echocardiography and statistical analysis, see the online supplemental methods section.

RESULTS

Study populations

From a total of 198 selected patients, 105 patients with COPD were included in the study, with no other condition susceptible

to explain PH (see figure 2 and table 2). Among the 105 patients with COPD, 20 patients demonstrated severe PH, as defined by mPAP at RHC superior to 35 mm Hg, as the last world PH symposium proposed this cut-off.³ These severe patients with PH were FEV₁-matched and age-matched to 20 other patients with COPD without severe PH (mPAP <35 mm Hg) (table 2). The 65 remaining patients unable to be matched were presented separately (see online supplementary table S1).

Demographic characteristics, pulmonary functions and clinical, hemodynamic and biological data of both study populations are shown in table 2. There was no difference in demographic characteristics, CRP levels and lung function parameters between patients with COPD with and without severe PH, except for transfer lung capacity of carbon monoxide (TLCO). The patients with COPD with severe PH had significantly lower values of both TLCO and 6-MWT, deeper hypoxia and higher brain natriuretic peptide (BNP) levels. There was no left ventricular dysfunction in both groups (data not shown). All patients with COPD carried out RHC. The mPAP ranged from 35 to 58 mm Hg and from 13 to 34 mm Hg in patients with severe PH and without severe PH, respectively. Moreover, a precapillary PH was demonstrated in all patients with COPD with PH, as assessed by pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) values less than 15 mm Hg and gradient values superior to 10 mm Hg.

Relationship between mPAP and quantitative CT parameters

Morphological CT parameters were assessed in both groups of patients with COPD (table 3). At alveolar level, emphysema (LAA%) was not significantly different between the two groups, and there was no significant correlation between emphysema and mPAP (see online supplementary table S2).

At the bronchial level, no significant difference was observed between patients with COPD with and without severe PH (table 3).

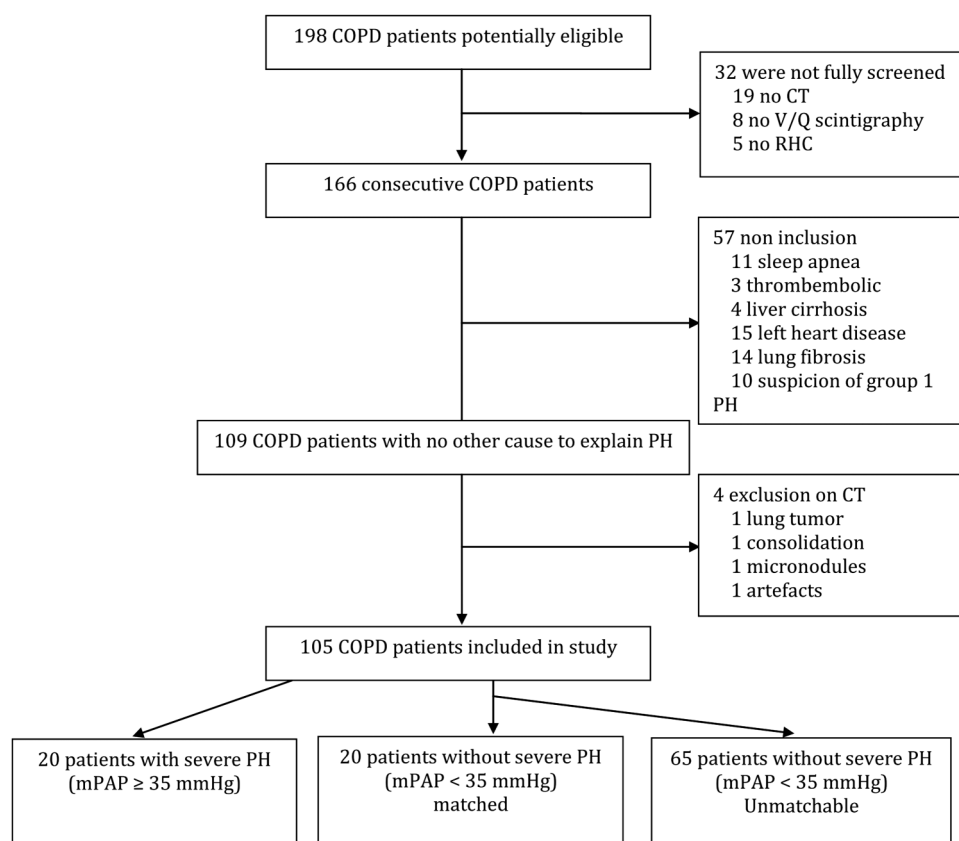


Figure 2 Study design. mPAP, mean pulmonary arterial pressure; PH, pulmonary hypertension; RHC, right heart catheterisation.

Pulmonary vasculature

However, for both groups, bronchial WT was positively correlated with mPAP (see online supplementary table S2).

At the vascular level, the ratio of the main pulmonary artery to the ascending aorta diameter (AP/AO) was greater in patients with COPD with severe PH than in patients without severe PH (table 3). AP/AO was not correlated to mPAP in patients with COPD with severe PH (see online supplementary table S2). However, a positive correlation was found between mPAP and AP/AO in the group of patients with COPD without severe PH (see online supplementary table S2, figure 3A, C). All parameters related to small vessels (ie, %CSA_{<5}, %CSA_{5–10}, CSN_{<5} and CSN_{5–10}) were greater in patients with COPD with severe PH than in patients without severe PH (table 3). In patients with severe PH, a positive correlation was found between mPAP

and %CSA_{<5}. Conversely, in patients without severe PH, mPAP was negatively correlated to %CSA_{<5} (figure 2B, D).

Factors influencing mPAP

Regarding variables from PFT, arterial blood gases, biology, CT and 6-MWT, in COPD without severe PH, significant univariate correlations were found between mPAP and various variables including PaO₂, TLCO%, BNP, AP/AO ratio, bronchial WT, CSAs and 6-MWT (see online supplementary table S2). Conversely, in patients with COPD with severe PH, significant correlations were found only between mPAP and both WT and CSAs (see online supplementary table S2).

Significant variables that were correlated with mPAP and not cross-correlated (see online supplementary tables S3 and S4) were entered in stepwise multiple regression analyses in order to find the best model fitting mPAP within the two groups of patients with COPD (table 4). In patients with severe PH, the best model associated WT, %CSA_{<5} and PaO₂ and explained 65% of the mPAP variations. Among these variables, mean %CSA_{<5} explained 36% of the mPAP variations alone, whereas WT and PaO₂ explained only 29% and 3%, respectively. In patients with COPD without severe PH, the best model explained 69% of mPAP variations, WT was the main factor explaining mPAP (26%), whereas PaO₂ and %CSA_{<5} explaining 13% and 9% of mPAP variations, respectively.

Factors predicting severe PH

Since %CSA_{<5} was correlated to mPAP in opposite ways in patients with and without severe PH, it seems hard to predict the presence of severe PH in patients with COPD using %CSA_{<5} only. We thus built four combined paw scores using two

Table 2 Characteristics of COPD subjects

	COPD subjects with severe PH	COPD subjects without severe PH	p Value
N	20	20	
Age			
Years	67±9	66±8	0.766
Sex ratio			
Men/women	17/3	15/5	0.693
BMI			
kg/m ²	26±5	24±4	0.123
Tobacco			
Smoking status (Y/N)	20/0	20/0	
Current smoker (Y/N)	5/15	7/13	0.731
Pack year (no)	31 (11–47)	31 (25–40)	0.978
PFT			
FEV ₁ (% pred)	52±21	52±21	0.983
FEV ₁ /FVC (%)	54±15	50±15	0.380
TLC (%)	99 (92–105)	107 (94–130)	0.182
RV (%)	124 (98–148)	134 (102–225)	0.579
TLCO (%)	24±10	40±22	0.008
Six-minute walk test			
Distance (m)	271±100	370±68	0.003
Arterial blood gases (ambient air)			
PaO ₂ (mm Hg)	51±6	59±13	0.014
PaCO ₂ (mm Hg)	36 (29–41)	37 (34–43)	0.228
Right heart catheterisation			
mPAP (mm Hg)	45±6	25±5	<0.001
sPAP (mm Hg)	70±14	39±8	<0.001
dPAP (mm Hg)	28±4	15±4	<0.001
PCWP (mmHg)	9±2	7±3	0.012
Gradient (mm Hg)	20±4	9±3	<0.001
PVR (Wood unit)	8±2	4±1	<0.001
PVR _i (Wood unit/m ²)	14±5	7±1	<0.001
Cardiac output (L/min)	5±1.2	5±1.2	0.557
Cardiac index (L/min/m ²)	3±0.7	3±0.5	0.556
Biology			
CRP (pg/mL)	5±3	6±2	0.377
BNP (mg/mL)	481±114	177±215	0.019

Severe PH in COPD is defined mPAP ≥35 mm Hg, without <35 mm Hg. Data are means±SD for continuous normal variables, or median with IQR if their distribution is not normal. Comparisons of continuous variables were made with the t tests or with Mann–Whitney tests for non-parametric variables. Categorical variables were analysed with Fisher's exact tests.

BMI, body mass index; BNP, brain natriuretic peptide; CRP, C reactive protein; Gradient, dPAP-PCWP; m, s, dPAP, mean, systolic, diastolic pulmonary arterial pressure; PCWP, pulmonary capillary wedge pressure; PFT, pulmonary function test; PH, pulmonary hypertension; pred, predicted; PVR, pulmonary vascular resistance; PVR_i, indexed PVR; RV= residual volume; TLC= total lung capacity; TLCO= transference lung capacity of carbon monoxide.

Table 3 Comparison of CT parameters between groups

	COPD subjects with severe PH	COPD subjects without severe PH	p Value
N	20	20	
Bronchi			
WA	19.06±5.17	20.16±4.76	0.490
Mean lumen area (mm ²)	11.14±4.67	14.30±5.60	0.060
WA%	1.91±0.62	1.62±0.40	0.079
Mean wall thickness (mm)	1.22±0.14	1.18±0.14	0.401
Parenchyma			
Emphysema			
Low lung attenuation area per cent	11.85±14.59	16.97±13.54	0.257
Vessels			
Large vessels			
AP/AO	1.04±0.13	0.91±0.21	0.022
Small vessels			
%CSA _{<5}	0.52±0.19	0.39±0.14	0.019
%CSA _{5–10}	0.16±0.03	0.12±0.03	<0.001
CSN _{<5}	0.32 (0.25–0.49)	0.22 (0.19–0.36)	0.034
CSN _{5–10}	0.02 (0.02–0.02)	0.01 (0.01–0.02)	<0.001

Data are means with SD for continuous normal variables, or median with IQR if their distribution is not normal. Comparisons of continuous variables were made with the t tests, or with Mann–Whitney tests for non-parametric variables.

%CSA_{<5}, percentage of total lung area taken up by the cross-sectional area of pulmonary vessels less than 5 mm²; %CSA_{5–10}, percentage of total lung area taken up by the cross-sectional area of pulmonary vessels between 5 and 10 mm²; AO, aorta; AP, pulmonary artery truncus; CSN_{<5}, number of vessels less than 5 mm² normalised by total lung area; CSN_{5–10}, number of vessels between 5 and 10 mm² normalised by total lung area; PH, pulmonary hypertension; WA, mean wall area (mm²); WA%, mean wall area percentage.

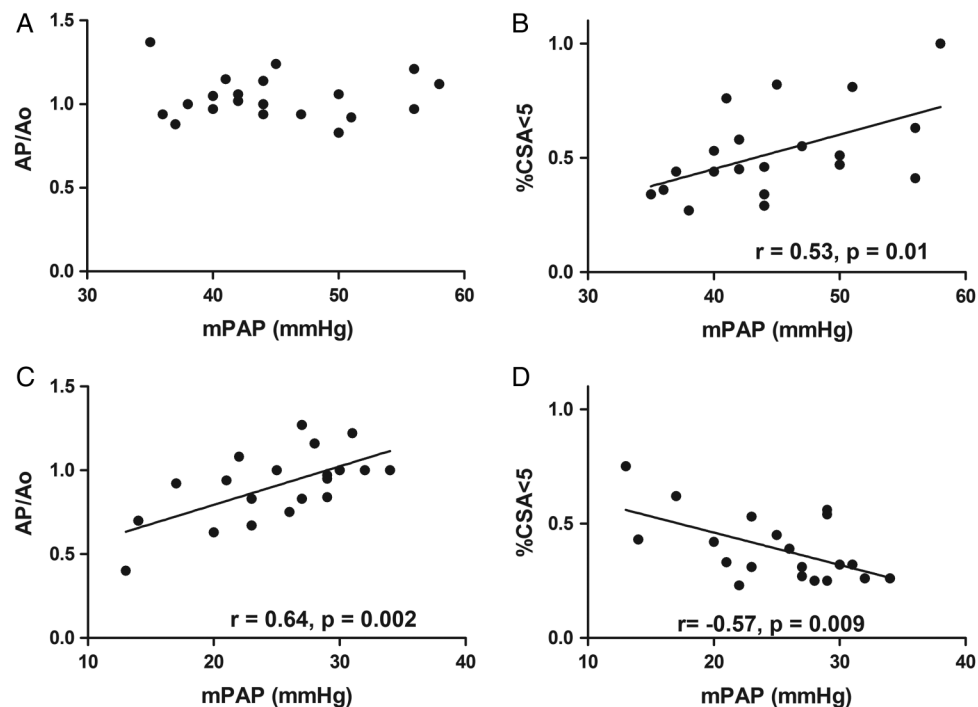


Figure 3 Correlation between mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and CT parameters such as ratio of pulmonary artery truncus to aorta diameter (AP/Ao), % cross-sectional area (%CSA). (A and B) represent patients with COPD with severe pulmonary hypertension (PH). (C and D) represent patients with COPD without severe PH.

to three variables best correlated to mPAP (ie, %CSA_{<5}, WT, PaO₂) and assessed their corresponding ROC curves for the 40 matched patients and for all the 105 included patients (see online supplementary figures S1 and S2). Characteristics of these ROC curves for each combination are reported in table 5. For the 40 matched patients, AUCs from each combination including %CSA_{<5} were significant and greater than 0.5. The best paw score associated the three variables %CSA_{<5}, PaO₂ and WT and allowed a high negative predictive value (NPV) of 95% with a sensitivity and specificity of 75% and 70%, respectively. These results were confirmed with all the 105 patients initially included in the study: AUCs from each combination were also significant and greater than 0.5, and the paw score that associates the three variables allowed even greater NPV and specificity, and the sensitivity is unchanged.

DISCUSSION

Taken together, this study demonstrated that mPAP can be predicted differently in patients with COPD with and without severe PH by using CT. In patients with severe PH, increased

small pulmonary vessels area (%CSA_{<5}) is the factor mostly associated with mPAP elevation, whereas it is increased WT in patients without severe PH. The %CSA_{<5}, WT and PaO₂ were the three best correlated parameters with mPAP. These three variables could be combined to build a paw score helpful for predicting the absence of severe PH in patients with COPD.

Identifying clinically meaningful COPD phenotypes is of critical importance for patient care,^{26 27} since COPD is a complex and heterogeneous disease that the sole FEV₁/FVC cut-off of 70% cannot describe adequately.²⁸ To better characterise patients with COPD on the basis of attributes that differ between individuals and relate with clinically relevant outcomes, CT has long been shown to provide invaluable clues by allowing non-invasive and quantitative assessment of structural alterations from bronchi and lung parenchyma.^{29–31} However, few studies have focused on vessel modifications in COPD subjects,^{14–17 32} though there are compelling evidence that COPD is also mediated by a pulmonary vascular disease.^{33–35} It has been shown that the toxicity of tobacco smoke affects bronchi and parenchyma, but can also directly alter vessels in both animals

Table 4 Multivariate analysis of mPAP in patients with COPD with and without severe PH

Population studied	Model	Independent variables	Partial R ²	Increase in mPAP per unit increase in independent variable (mm Hg)	p Value
COPD subjects with severe PH (n=20)	R ² =0.65; p<0.007 F=9.6 Mean square error=19.6	PaO ₂	0.03	-0.18	0.250
		WT	0.29	26.3	0.002
		%CSA _{<5}	0.36	21.1	0.001
COPD subjects without severe PH (n=20)	R ² =0.69; p<0.0002 F=12.1 Mean square error =12.34	PaO ₂	0.13	-0.17	0.020
		WT	0.26	22.0	0.002
		%CSA _{<5}	0.09	-13.5	0.040

Severe PH in COPD is defined as mPAP ≥35 mm Hg, without <35 mm Hg.

%CSA_{<5}, percentage of total lung area taken up by the cross-sectional area of pulmonary vessels less than 5 mm²; mPAP, mean pulmonary arterial pressure; PH, pulmonary hypertension; WT, mean wall thickness (mm).

Pulmonary vasculature

Table 5 Receiver operating characteristic curve analyses predicting the presence of mPAP >35mm Hg

Paw scores	AUC	AUC's SE	p Value	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value		Negative predictive value	
						5% prev	13% prev	5% prev	13% prev
40 patients									
%CSA _{<5} +PaO ₂ +WT	0.790	0.073	<0.001	0.750 (0.615 to 0.884)	0.700 (0.557 to 0.842)	0.116 (0.016 to 0.215)	0.272 (0.134 to 0.409)	0.982 (0.940 to 1.000)	0.949 (0.880 to 1.000)
%CSA _{<5} +PaO ₂	0.796	0.069	0.004	0.700 (0.557 to 0.842)	0.800 (0.676 to 0.923)	0.156 (0.043 to 0.268)	0.343 (0.195 to 0.490)	0.981 (0.938 to 1.000)	0.947 (0.877 to 1.000)
%CSA _{<5} +WT	0.741	0.079	0.002	0.650 (0.502 to 0.797)	0.800 (0.676 to 0.923)	0.146 (0.036 to 0.255)	0.327 (0.181 to 0.472)	0.977 (0.930 to 1.000)	0.939 (0.864 to 1.000)
PaO ₂ +WT	0.651	0.086	0.077	ND	ND	ND	ND	ND	ND
105 patients									
%CSA _{<5} +PaO ₂ +WT	0.828	0.050	<0.001	0.750 (0.667 to 0.832)	0.800 (0.723 to 0.876)	0.165 (0.094 to 0.235)	0.359 (0.267 to 0.450)	0.984 (0.959 to 1.000)	0.955 (0.915 to 0.994)
%CSA _{<5} +PaO ₂	0.839	0.043	<0.001	0.950 (0.908 to 0.991)	0.538 (0.442 to 0.663)	0.038 (0.001 to 0.074)	0.235 (0.153 to 0.316)	0.995 (0.981 to 1.000)	0.986 (0.963 to 1.000)
%CSA _{<5} +WT	0.765	0.060	<0.001	0.650 (0.558 to 0.741)	0.825 (0.752 to 0.897)	0.164 (0.093 to 0.234)	0.357 (0.265 to 0.448)	0.978 (0.949 to 1.000)	0.940 (0.894 to 0.985)
PaO ₂ +WT	0.738	0.056	<0.001	0.750 (0.667 to 0.832)	0.613 (0.519 to 0.706)	0.092 (0.036 to 0.147)	0.224 (0.144 to 0.303)	0.979 (0.951 to 1.000)	0.943 (0.898 to 0.987)

Data are absolute number with 95% CI.

AUC, area under curve; %CSA_{<5}, percentage of total lung area taken up by the cross-sectional area of pulmonary vessels less than 5 mm²; mPAP, mean pulmonary arterial pressure; ND, not determined; PaO₂, oxygen arterial partial pressure (mm Hg); prev, prevalence of severe PH in the COPD population; WT, mean wall thickness (mm).

and humans.³⁶ We hypothesised that CT measurement of intrapulmonary vessels, especially the more distal ones, could be a tool to characterise COPD subjects in addition to standard measurements of emphysema and bronchial thickness.¹³

In the present study, we focused our attention towards a population of patients with COPD suffering from severe PH. We paid a special attention to select patients without severe PH as close as possible to those with severe PH in terms of age and FEV₁ to limit potential bias on demographic and functional differences. Thus, the clinical features of patients with severe PH shared close similarities to those without severe PH. For instance, the tobacco smoke consumption was not different between groups, which suggest a different susceptibility against tobacco toxicity. However, severe PH in COPD is occasional, as observed previously,^{4, 5} and there is, up to now, no clear evidence to explain its aetiology.¹⁰ In the study of Chaouat *et al*,⁵ none of the PFT parameters, emphysema or hypoxaemia were found to be predictors of PH in an univariate analysis of mPAP in a population of 11 patients with COPD with severe PH and no other condition susceptible to explain PH. Thus, it was supposed that severe PH in COPD was more likely explained by a vascular alteration rather than an airway disease. In patients with severe PH from the present study, %CSAs and WT were found to be predictors of mPAP, while PaO₂, FEV₁%, TLCO% and LAA% were not. The main morphological parameter able to explain mPAP variation in this population was %CSA_{<5}, suggesting a striking difference in the pathophysiology of increased mPAP between the two populations of COPD. By applying a previously reported method for quantifying small vessels on CT examinations,¹⁶ we have found that both %CSA_{<5} and %CSA₅₋₁₀ were higher in patients with COPD with severe PH compared with those without severe PH. In this latter population, at univariate analysis, both PaO₂ and TLCO% were found to be correlated with mPAP, a finding consistent with the central role played by hypoxaemia in the development of PH.^{5, 37} There was a lack of correlation between emphysema and PH, which is in line with previous studies.^{13, 16, 37} In addition, we recently

reported that the main parameter able to explain mPAP in patients with COPD without severe PH was WT,¹³ which was confirmed in this study.

Correlations between %CSAs and mPAP found herein deserve further comments. In the literature evaluation of %CSAs values in COPD subjects with PH was significantly negatively correlated, as in our population of COPD without severe PH. This result was ascribed to reduced distensibility of small vessels, hypoxic vasoconstriction and vessel destruction secondary to emphysema.^{16, 38} However, this study was performed based on a population of COPD subjects with severe emphysema, as assessed by a visual of percentage of emphysema on CT scans superior to 75%,^{7, 16} and corresponding to total automatic quantification (LAA%) of 25%, and in which the degree of mPAP elevation did not exceed the threshold of severe PH. This difference between subjective visual grading and objective automatic quantification with LAA% of emphysema is already described in the literature.¹¹ In our population with severe PH by contrast, the correlation between %CSAs and mPAP was positive. Thus, our results are complementary from the previous report of Matsuoka *et al*,¹⁶ and bring additional insight into the ability of CT to discriminate COPD phenotypes on a small vessel-based analysis. Moreover, a marker for PH in COPD (ie, AP/AO)³⁹ was not correlated to mPAP in our COPD population with severe PH.

In this COPD population, the absence of severe PH could be well predicted by the paw score (ie, combination of PaO₂, WT and %CSA_{<5}), as demonstrated by the ROC curve analysis. The distal vascular parameter %CSA_{<5} was needed, whatever the combination of parameters tested to significantly distinguish between severe PH and others, emphasising the role of distal vessels changes in severe PH of COPD. Interestingly, the best paw score allowed us to discriminate, non-invasively, matched patients with COPD with severe PH from patients with COPD without severe PH. From the perspective of clinical conditions, patients with paw score higher than 5 should be selected to perform RHC. Indeed, whereas the NPV was very high (95%–

98%), the positive predictive value was low (12%–27%). We confirmed the clinical interest of this paw score in a larger group of patients with COPD (n=105). However, these results could be interestingly confirmed in a new prospective cohort. Since the prevalence of severe PH in COPD is low,^{3–5 7} it is thus necessary to better characterise these patients whom reports are still limited in number of subjects.^{4 5 40}

Several limitations can be discussed in this study. The study was observational and retrospective. It was not possible to draw causal relationship between increased size and number of small vessels and severe degree of PH in COPD. However, mild-to-moderate PH in COPD is commonly thought to be caused by the destruction of small pulmonary vessels as a consequence of emphysema, or secondary to vasoconstriction in response to hypoxia. To support these hypotheses, mild-to-moderate PH in COPD has been consistently reported to be related with a reduction of small vessel areas¹⁶ or volume³⁸ at CT examination. Our study is the first to report in vivo data on the distal vascular bed in patients with COPD with severe PH. Moreover, this study indicates that, in this subpopulation of COPD, development of PH is not related to a decrease but to an increase in pulmonary vasculature area. However, veins and arteries were not distinguished by our methods of small vessel measurements. Nevertheless, in our population, pulmonary venous pressures (PCWP) at RHC were not different between groups, as well as the left heart functions at echocardiography. PH was always confirmed to be precapillary at RHC, and %CSA measurements correlated with all values of pulmonary arterial pressures (systolic PAP, diastolic PAP, mean PAP), but not with pulmonary venous pressures (PCWP). Thus, we are reliably confident that postcapillary venous pressures cannot account for %CSA variations. In addition, %CSA measurements allowed a global quantification of vessel areas, irrespective of wall or lumen changes. We cannot speculate about the balance between vessel wall thickening and lumen narrowing in the pathophysiology of severe PH. Finally, patients with COPD without severe PH were a mix of patients with and without PH, since the aim of the study was to discriminate severe PH among the whole population of COPD.

CONCLUSION

CT measurements of small vessels support a distinct vessel-related phenotype in patients with COPD with severe PH, and combined with WT and PaO₂ parameters in the paw score, which may offer a non-invasive tool to select patients for RHC or for non-invasive follow-up in longitudinal study.

Contributors Conception and design: FC, GD, PB and FL; analysis and interpretation: FC, GD, PB and FL; drafting the manuscript for important intellectual content: FC, GD, PB and FL; revising the manuscript for important intellectual content: FC, GD, PB and FL; final approval of the manuscript: FC, GD, CD, EB, VF-M, P-OG, MM, FB, FP, RM, PB and FL.

Funding This study was achieved within the context of the Laboratory of Excellence TRAIL ANR-10-LABX-57.

Competing interests PB reports grants from Fondation du Souffle—Fonds de dotation Recherche en Santé Respiratoire, personal fees and non-financial support from Novartis, grants and personal fees from Pierre Fabre, personal fees and non-financial support from Chiesi, personal fees and non-financial support from Boehringer Ingelheim, personal fees and non-financial support from Takeda, personal fees and non-financial support from AstraZeneca, outside the submitted work. In addition, PB has a patent new compositions and methods of treating and/or preventing COPD. Patent submitted 28 Jan 2015 (EP N°1512886.6) pending. P-OG reports personal fees and non-financial support from Novartis, personal fees from Pierre Fabre, non-financial support from Chiesi, non-financial support from Takeda, personal fees and non-financial support from Boehringer Ingelheim, outside the submitted work.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Our institutional review board and the local ethic committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Weitzenblum E, Hirth C, Ducloux A, *et al*. Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1981;36:752–8.
- Cooper R, Ghali J, Simmons BE, *et al*. Elevated pulmonary artery pressure. An independent predictor of mortality. *Chest* 1991;99:112–20.
- Seeger W, Adir Y, Barberà JA, *et al*. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(25Suppl):D109–16.
- Thabut G, Dauriat G, Stern JB, *et al*. Pulmonary hemodynamics in advanced COPD candidates for lung volume reduction surgery or lung transplantation. *Chest* 2005;127:1531–6.
- Chaouat A, Bugnet AS, Kadaoui N, *et al*. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:189–94.
- Chaouat A, Naeije R, Weitzenblum E. Pulmonary hypertension in COPD. *Eur Respir J* 2008;32:1371–85.
- Scharf SM, Iqbal M, Keller C, *et al*. Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:314–22.
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, *et al*. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(25Suppl):D34–41.
- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, *et al*. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(1 Suppl):S43–54.
- Weitzenblum E, Chaouat A. Severe pulmonary hypertension in COPD: is it a distinct disease? *Chest* 2005;127:1480–2.
- Bankier AA, De Maertelaer V, Keyzer C, *et al*. Pulmonary emphysema: subjective visual grading versus objective quantification with macroscopic morphometry and thin-section CT densitometry. *Radiology* 1999;211:851–8.
- Hackx M, Bankier AA, Gevenois PA. Chronic obstructive pulmonary disease: CT quantification of airways disease. *Radiology* 2012;265:34–48.
- Dournes G, Laurent F, Coste F, *et al*. Computed tomographic measurement of airway remodeling and emphysema in advanced chronic obstructive pulmonary disease. Correlation with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:63–70.
- Matsuoka S, Washko GR, Dransfield MT, *et al*. Quantitative CT measurement of cross-sectional area of small pulmonary vessel in COPD: correlations with emphysema and airflow limitation. *Acad Radiol* 2010;17:93–9.
- Uejima I, Matsuoka S, Yamashiro T, *et al*. Quantitative computed tomographic measurement of a cross-sectional area of a small pulmonary vessel in nonsmokers without airflow limitation. *Jpn J Radiol* 2011;29:251–5.
- Matsuoka S, Washko GR, Yamashiro T, *et al*. Pulmonary hypertension and computed tomography measurement of small pulmonary vessels in severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:218–25.
- Estépar RS, Kinney GL, Black-Shinn JL, *et al*. Computed tomographic measures of pulmonary vascular morphology in smokers and their clinical implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:231–9.
- Dournes G, Coste F, Dromer C, *et al*. Evaluation des altérations bronchiques et vasculaires par TDM chez les patients BPCO compliqués d'hypertension Pulmonaire sévère. *Journée Française de radiologie* 2014;62:356.
- Coste F, Dournes G, Dromer C, *et al*. Measurement of small pulmonary vessels by using computed tomography (CT) in COPD patients with severe pulmonary hypertension [abstract]. *ERJ* 2014;44 (supp 58):P2333.
- Dournes G. CT measurement of small vessels as a tool to phenotype COPD subjects with severe pulmonary hypertension [abstract]. *ESTI* 2014;22:27.
- Wanger J, Clausen JL, Coates A, *et al*. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005;26:511–22.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, *et al*. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319–38.
- Montaudon M, Lederlin M, Reich S, *et al*. Bronchial measurements in patients with asthma: comparison of quantitative thin-section CT findings with those in healthy subjects and correlation with pathologic findings. *Radiology* 2009;253:844–53.
- Berger P, Perot V, Desbarats P, *et al*. Airway wall thickness in cigarette smokers: quantitative thin-section CT assessment. *Radiology* 2005;235:1055–64.
- Montaudon M, Berger P, de Dietrich G, *et al*. Assessment of airways with three-dimensional quantitative thin-section CT: in vitro and in vivo validation. *Radiology* 2007;242:563–72.
- Han MK, Agusti A, Calverley PM, *et al*. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:598–604.
- Dirksen A, MacNee W. The search for distinct and clinically useful phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1045–6.
- Han MK, Kim MG, Mardon R, *et al*. Spirometry utilization for COPD: how do we measure up? *Chest* 2007;132:403–9.

Pulmonary vasculature

- 29 Han MK, Bartholmai B, Liu LX, *et al.* Clinical significance of radiologic characterizations in COPD. *COPD* 2009;6:459–67.
- 30 Galban CJ, Han MK, Boes JL, *et al.* Computed tomography-based biomarker provides unique signature for diagnosis of COPD phenotypes and disease progression. *Nat Med* 2012;18:1711–15.
- 31 Mohamed Hoessein FA, Schmidt M, Mets OM, *et al.* Discriminating dominant computed tomography phenotypes in smokers without or with mild COPD. *Respir Med* 2014;108:136–43.
- 32 Matsuura Y, Kawata N, Yanagawa N, *et al.* Quantitative assessment of cross-sectional area of small pulmonary vessels in patients with COPD using inspiratory and expiratory MDCT. *Eur J Radiol* 2013;82:1804–10.
- 33 Wright JL, Levy RD, Churg A. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment. *Thorax* 2005;60:605–9.
- 34 Wright JL, Petty T, Thurlbeck WM. Analysis of the structure of the muscular pulmonary arteries in patients with pulmonary hypertension and COPD: National Institutes of Health nocturnal oxygen therapy trial. *Lung* 1992;170:109–24.
- 35 Noureddine H, Gary-Bobo G, Alifano M, *et al.* Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circ Res* 2011;109:543–53.
- 36 Barbera JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003;21:892–905.
- 37 Biernacki W, Gould GA, Whyte KF, *et al.* Pulmonary hemodynamics, gas exchange, and the severity of emphysema as assessed by quantitative CT scan in chronic bronchitis and emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1509–15.
- 38 Wells JM, Iyer AS, Rahaghi FN, *et al.* Pulmonary artery enlargement is associated with right ventricular dysfunction and loss of blood volume in small pulmonary vessels in chronic obstructive pulmonary disease. *Circ Cardiovasc Imaging* 2015;8: pii: e002546.
- 39 Wells JM, Washko GR, Han MK, *et al.* Pulmonary arterial enlargement and acute exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2012;367:913–21.
- 40 Carlsen J, Hasseriis Andersen K, Boesgaard S, *et al.* Pulmonary arterial lesions in explanted lungs after transplantation correlate with severity of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:347–54.

Publication n°3

« Functional and histological characterization of a rodent model relevant to the human severe form of pulmonary arterial hypertension »

Florence Coste, Christelle Guibert, Mathilde Dubois, Arnaud Courtois, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau, Bernard Muller et Véronique Freund-Michel

En cours de soumission

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie grave, fréquemment diagnostiquée à un stade tardif d'évolution. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), correspondant au groupe 1 de la classification des HTP, est souvent une forme sévère de la maladie qui combine de multiples altérations au niveau des artères pulmonaires, en particulier des lésions caractéristiques et spécifiques telles que les lésions thrombotiques et plexiformes. Les modèles animaux utilisés afin de mimer les formes humaines d'HTAP sévère (HTAPs) nécessitent souvent des procédures longues et/ou complexes, et ne reproduisent pas la totalité des lésions observées dans la pathologie humaine. Ici, nous avons cherché à mieux caractériser un modèle de rat mimant l'HTAPs.

Dans cette étude, nous avons caractérisé d'un point de vue fonctionnel et histologique un modèle d'HTAPs chez le rat combinant une seule injection de monocrotaline avec un placement en hypoxie chronique de 4 semaines. Le développement d'une HTAPs dans ce modèle a été validé par l'observation d'une augmentation de la PAPm, d'un remodelage cardiaque intense, d'une inflammation et d'une hyperréactivité des artères pulmonaires. De plus, nous avons pu montrer que ce modèle de rat développait un remodelage artériel pulmonaire intense, avec épaississement des parois vasculaires, occlusion luminale, et présence de lésions sévères très ressemblantes à celles observées chez l'Homme, telles que les lésions thrombotiques, plexiformes, et néointimales concentriques non laminaires.

Finalement, ce modèle, combinant deux techniques conventionnelles et faciles à mettre en œuvre, pourrait être d'un grand intérêt pour mieux comprendre la physiopathologie de l'HTAPs et définir de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette maladie.

LETTER TO THE EDITOR

**Functional and histological characterization of
a rodent model relevant to the human severe form
of pulmonary arterial hypertension**

Florence Coste^{1, 2, 3}, Christelle Guibert^{1, 2}, Mathilde Dubois^{1, 2}, Arnaud Courtois^{1, 2},
Roger Marthan^{1, 2, 3}, Jean-Pierre Savineau^{1, 2}, Bernard Muller^{1, 2}, Véronique Freund-Michel^{1, 2}

¹ INSERM, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux,
France. ² Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045,
F-33000, Bordeaux, France. ³ CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding author

Florence COSTE

Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, Université Bordeaux,
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Tel: +33 5 57 57 16 94

Fax: +33 5 57 57 16 95

E-mail: florence-coste@hotmail.fr

Co-authors email :

florence-coste@hotmail.fr; christelle.guibert@u-bordeaux.fr; mathilde.dubois@u-bordeaux.fr;
arnaud.courtois@u-bordeaux.fr; roger.marthan@u-bordeaux.fr; jean-pierre.savineau@u-bordeaux.fr;
bernard.muller@u-bordeaux.fr; veronique.michel@u-bordeaux.fr

Running head: A relevant rat model of severe PAH (32 characters)

Keywords: animal model, plexiform lesions, pulmonary arterial hypertension

Total word count: 1480

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe form of pulmonary hypertension that combines multiple alterations of pulmonary arteries, including, in particular, thrombotic and plexiform lesions. Multiple-pathological-insult animal models, developed to more closely mimic this human severe PAH form, often require complex and/or long experimental procedures while not displaying the entire panel of characteristic lesions observed in the human disease. In this study, we characterized a rat model of severe PAH generated by combining a single injection of monocrotaline with 4 weeks exposure to chronic hypoxia. This model displays increased pulmonary arterial pressure, cardiac remodeling, pulmonary arterial inflammation, hyperresponsiveness and remodeling. In particular, severe pulmonary arteriopathy was observed, with thrombotic, neointimal and plexiform-like lesions very similar to those observed in human severe PAH. This model, based on the combination of two conventional and easy procedures, may therefore be valuable to further understand the pathophysiology of severe PAH and identify new potential therapeutic targets in this disease.

Abstract word count: 155

FINDINGS

Pulmonary hypertension (PH) is a severe disease characterized by sustained elevated mean pulmonary arterial pressure (mPAP) over 25mmHg, development of right heart hypertrophy, leading to cardiac failure and finally death [1]. Pathobiology of PH includes pulmonary arterial inflammation, remodeling and altered reactivity, all contributing to increased pulmonary vascular resistances [2].

In the current PH classification, five groups have been identified based on pathophysiological and clinical considerations [1]. The pulmonary arterial hypertension (PAH) group (Group 1) includes idiopathic or familial forms of PH, as well as forms associated to other diseases such as connective tissue diseases or HIV infection [1, 3]. PAH is usually a severe form of PH that combines multiple alterations of pulmonary arteries, including thrombotic lesions, and/or complex and disorganized lesions characterized by a network of proliferated channels separated by core cells, the so-called plexiform lesions [4]. Current pharmacological treatments of PAH manage to slow the progression of the disease but do not afford a cure [5]. Since human samples are difficult to obtain, pertinent animal models are therefore needed to better understand PAH pathobiology and identify new therapeutic targets. However, classical PAH animal models, do not recapitulate the severe pathology of human disease and, in particular, often lack of plexiform lesions [6]. Multiple-pathological-insult models have therefore been developed to mimic more closely the human PAH pathophysiology. For instance, pneumonectomy has been associated to MCT injections, leading to neointimal [7] or plexiform-like lesions [8]. In other severe PAH models, SUGEN (SU5416, a tyrosine-kinase inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2) has been associated to hypoxia [9, 10] or pneumonectomy [11]. However, these models are time consuming, require experimented manipulation for surgical procedure and, to

the best of our knowledge, do not reproduce all of characteristic PAH lesions such as thrombotic lesions.

Our group has developed an alternative rat model of severe PAH, combining MCT injection to 3 weeks of chronic hypoxia (Hx) [6]. Additional preliminary experiments conducted in the same study on 4 rats suggested the development of plexiform lesions when the duration of Hx combined to MCT was increased to 4 weeks [6]. Herein, we aimed to confirm the interest of this latter model based on a combination of two conventional and easy procedures: a single MCT intraperitoneal injection associated to 4 weeks of Hx (MCT+Hx rats).

MCT+Hx rats were compared to 4 groups of rats: control, rats only exposed to Hx for 4 weeks (Hx rats), rats only injected with MCT and tested after 4 weeks (MCT rats), or rats injected with MCT and exposed to Hx for only 3 weeks according to protocols we have previously described [6, 12]. By assessing direct mPAP measurements, as previously described [12], we show, for the first time, in MCT+Hx rats, significant increased mPAP values compared to controls after 3 or 4 weeks of our protocol (Fig. 1A). These hemodynamic changes were in accordance with previous studies showing significant increase in right ventricle systolic pressure in this model [6, 13]. Together with increased mPAP values, right ventricular hypertrophy is another hallmark of PH, and we confirm, in the present study a significant right ventricular hypertrophy after MCT+Hx treatment, as previously reported by our group and others [6, 13] (Fig. 1B). However, our results also show that mPAP values were surprisingly lower after 4 weeks than after 3 weeks of the protocol. As reported in human PAH, compensation for right heart failure may be limited in time, and decompensated right ventricular failure then occurs, characterized by diastolic dysfunction and reduced cardiac output [14, 15]. These mechanisms lead to lower mPAP values, as observed in our

experiments after 4 weeks of the protocol. Our model combining MCT administration combined with 4 weeks of Hx may therefore be an interesting model of severe PAH, mimicking an advanced stage of the disease.

Complementary to hemodynamic disturbances, structural and functional alterations of pulmonary arteries in PAH include inflammation, altered reactivity and intense remodeling with a characteristic arteriopathy including thrombotic, neointimal and plexiform lesions [4, 16]. In the previous model combining MCT administration with 3 weeks of Hx, perivascular inflammatory infiltrates were previously evidenced [6]. We further characterized pulmonary arterial inflammation in the present model by showing increased levels of the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α released by pulmonary arteries in the MCT+Hx group compared to control animals (Fig. 1C and 1D). Increased secretion of such pro-inflammatory cytokines has been previously shown in PAH patients [17], with cytokine levels being predictive of outcome in these patients [18, 19]. Reproducing such increase in this experimental model may therefore be of valuable importance in terms of evaluating PAH severity and outcomes.

We also evaluated, for the first time in MCT+Hx rats, pulmonary arterial reactivity by dissecting intrapulmonary arteries from the left lung and mounting them in isolated organ baths, as previously described [12]. Our results show that pulmonary arteries from the MCT+Hx group displayed hyperreactivity to phenylephrine or to prostaglandin F 2α (PGF 2α), and that this hyperreactivity was even significantly greater compared to that in MCT and/or Hx groups (Fig. 2). In PAH, a resting vasoconstriction of pulmonary arteries contributes to the reduction in vascular caliber [20]. Altered reactivity of pulmonary arteries to vasoconstrictors such as endothelin-1, serotonin, angiotensin II, phenylephrine or PGF 2α has been well documented in animal models of PH, in particular those induced by Hx or by MCT [12, 21, 22]. We show, in this study, that the model combining MCT administration to 4 weeks of Hx

also reproduces and amplifies this aspect of PAH pathophysiology, and may therefore be helpful to further characterize the pathophysiological mechanisms of pulmonary arterial altered reactivity.

Finally, since there is no curative options in PAH today, many studies currently focus on pulmonary arterial remodeling to define new potential therapeutic targets [16, 23]. In patients with PAH, this remodeling includes pulmonary arterial medial hypertrophy and luminal occlusion, as well as concentric laminar and non-laminar intimal fibrosis, eccentric, plexiform and thrombotic lesions [4, 16]. In the MCT+Hx group, pulmonary arteries displayed classical pathophysiological aspects of PAH, *i.e.* pulmonary arterial wall thickening (Fig. 3A and B) and luminal occlusion (Fig. 3C and D) [6]. Regarding human-like characteristic PAH lesions, we also confirmed the presence of plexiform-like lesions (Fig. 3E1 to 4), as previously suggested [6]. Interestingly, as described in the Sugen model [9], two kinds of plexiform-like complex lesions were observed in the MCT+Hx model: stalk-like lesions formed within the blood lumen (Fig. 3E1 and 2) and aneurysm-like lesions extending into the parenchyma and going beyond the edge of the vessel lumen (Fig. 3E3 and 4). As both types of plexiform lesions are observed in human PAH [9], these results therefore reinforce the relevance of the present model when studying PAH pulmonary arteriopathy. We also confirmed the presence of thrombotic lesions (Fig. 3E5). To the best of our knowledge, the present model is the only PAH animal model able to generate such lesions. Finally, for the first time in this MCT+Hx model, we also showed the presence of other characteristic human-like lesions. In particular, eccentric (Fig. 3E6) and concentric non-laminar intimal thickening lesions (Fig. 3E7 and 8) were observed, similar to those observed in human severe PAH [4]. A further characterization of the concentric non-laminar intimal thickening lesions showed positive staining for α -smooth muscle actin (Fig. 3E7) but negative staining for the von Willebrand factor (Fig. 3E8). This suggests predominance of smooth muscle cells and/or

myofibroblasts rather than endothelial cells in these lesions, in accordance with observations of such lesions in human PAH [4, 24].

If classical characteristics of pulmonary arterial remodeling, *i.e.* medial thickening and luminal occlusion, are easily reproduced in classical models of PAH such as MCT treatment, other severe PAH specific lesions are not observed in these models. This explains the need for developing alternative models more closely related to human PAH pathophysiology. Models such as pneumonectomy associated to MCT injections [7, 8], or the Sugden model [9], lead to lesions very close to the pulmonary arteriopathy observed in human severe PAH. However, some human lesions, *i.e.* thrombotic lesions, are still lacking, and the procedures required are often complex and/or long. In this respect, the present model combining MCT and 4 weeks of Hx may be a valuable alternative model, with an easier protocol realized in a reasonable time.

In conclusion, we show here that combining MCT injection with 4 weeks of exposure to chronic hypoxia in rats generates a relevant model to the pathogenesis of human severe PAH. In particular, it reproduces multiple structural and functional alterations of pulmonary arteries, including inflammation, altered reactivity and intense remodeling. Moreover, this model displays a pulmonary arteriopathy with thrombotic, neointimal and plexiform-like lesions, very similar to those observed in human severe PAH. As human samples of PAH are difficult to obtain, the present model, using a simple protocol performed in only one month, may therefore be valuable to further understand the pathophysiology of severe PAH and identify new potential therapeutic targets in this disease.

List of abbreviations:

PH: pulmonary hypertension

mPAP: mean pulmonary arterial pressure

PAH: pulmonary arterial hypertension

MCT: monocrotaline

Hx: hypoxia

CTRL: control

RV: right ventricle

LV: left ventricle

S: septum

IL-1 β : interleukine -1 β

TNF- α : tumor necrosis factor α

PHE: phenylephrine

PGF2 α : prostaglandin F2 α

SEM: standard error of the mean

Ethics approval and consent to participate: All animal studies were made according to European and French directives about vertebrate animals protection use for animal experiments. Agreement was obtained from French authorities (number A33-063-907) and all the protocols used were approved by the local ethics committee (Comité d'éthique regional d'Aquitaine, protocol number: 50110016-A).

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and materials: The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article.

Competing interests: On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Funding/Sources of support:

This work was supported by INSERM and University of Bordeaux

Authors' contributions: Conception and design: F.C., V.F.M.; Analysis and interpretation: F.C., V.F.M; Drafting the manuscript for important intellectual content: F.C., V.F.M.; Revising the manuscript for important intellectual content: F.C., R.M., B.M., V.F.M.; final approval of the manuscript: F.C., C.G., M.D., A.C., R.M., J.P.S., B.M., V.F.M.

Acknowledgments: The authors thank Mrs M. Lepiez and Mrs E. Poinama for excellent animal care, and Dr C. Toussaint for his technical assistance with mPAP measurements. The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging.

References

1. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, et al: **2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT).** *Eur Heart J* 2016, **37**:67-119.
2. Tudor RM, Archer SL, Dorfmuller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW: **Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **62**:D4-12.

3. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M: **Management of pulmonary arterial hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2015, **65**:1976-1997.
4. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM: **Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2004, **43**:25S-32S.
5. Hoeper MM, McLaughlin VV, Dalaan AM, Satoh T, Galie N: **Treatment of pulmonary hypertension.** *Lancet Respir Med* 2016, **4**:323-336.
6. Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, Ohnishi K, Masuda H, Dahan D, Takeya M, Guibert C, Marthan R: **Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension.** *J Vasc Res* 2012, **49**:33-42.
7. Okada K, Tanaka Y, Bernstein M, Zhang W, Patterson GA, Botney MD: **Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension.** *Am J Pathol* 1997, **151**:1019-1025.
8. White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria, II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, et al: **Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **293**:L583-590.
9. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M: **Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension.** *Circulation* 2010, **121**:2747-2754.
10. Rafikova O, Rafikov R, Kumar S, Sharma S, Aggarwal S, Schneider F, Jonigk D, Black SM, Tofovic SP: **Bosentan inhibits oxidative and nitrosative stress and rescues occlusive pulmonary hypertension.** *Free Radic Biol Med* 2013, **56**:28-43.
11. Happe CM, de Raaf MA, Rol N, Schaliij I, Vonk-Noordegraaf A, Westerhof N, Voelkel NF, de Man FS, Bogaard HJ: **Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016, **310**:L1088-1097.
12. Freund-Michel V, Cardoso Dos Santos M, Guignabert C, Montani D, Phan C, Coste F, Tu L, Dubois M, Girerd B, Courtois A, et al: **Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental Pulmonary Hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2015, **192**:342-355.
13. Lan B, Hayama E, Kawaguchi N, Furutani Y, Nakanishi T: **Therapeutic efficacy of valproic acid in a combined monocrotaline and chronic hypoxia rat model of severe pulmonary hypertension.** *PLoS One* 2015, **10**:e0117211.
14. Guyton AC, Lindsey AW, Gilluly JJ: **The limits of right ventricular compensation following acute increase in pulmonary circulatory resistance.** *Circ Res* 1954, **2**:326-332.
15. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupuis J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, et al: **Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure.** *Circulation* 2006, **114**:1883-1891.
16. Guignabert C, Tu L, Le Hiress M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, Huertas A, Humbert M, Montani D: **Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer.** *Eur Respir Rev* 2013, **22**:543-551.
17. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D: **Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **151**:1628-1631.
18. Cracowski JL, Chabot F, Labarere J, Faure P, Degano B, Schwebel C, Chaouat A, Reynaud-Gaubert M, Cracowski C, Sitbon O, et al: **Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2014, **43**:915-917.
19. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, et al: **Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension.** *Circulation* 2010, **122**:920-927.

20. Dantzker DR, Bower JS: **Pulmonary vascular tone improves VA/Q matching in obliterative pulmonary hypertension.** *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1981, **51**:607-613.
21. Billaud M, Dahan D, Marthan R, Savineau JP, Guibert C: **Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension.** *Respir Res* 2011, **12**:30.
22. Konik EA, Han YS, Brozovich FV: **The role of pulmonary vascular contractile protein expression in pulmonary arterial hypertension.** *J Mol Cell Cardiol* 2013, **65**:147-155.
23. Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, Gunther S, Girerd B, Jais X, Algalarrondo V, Price LC, Savale L, Sitbon O, et al: **Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension.** *Pharmacol Ther* 2014, **141**:172-191.
24. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al.: **Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry.** *Circulation* 1989, **80**:1198-1206.

Figure legends

Figure 1

(A) Mean pulmonary arterial pressure (mPAP in mmHg) measured in controls rats (CTRL), after chronic hypoxia (Hx), after monocrotaline injection (MCT) or after combination of MCT and 3 or 4 weeks of Hx (3wk or 4wk MCT+Hx). Data represent means \pm SEM with n=13-14 rats per group. ***p<0.001 *versus* controls. (B) Right ventricular hypertrophy expressed as the Fulton index (= Ratio of right ventricle weight (RV) to left ventricle plus septum weight (LV + S)) in the same experimental groups. Data represent means \pm SEM with n=14-15 rats per group. ***p<0.001 *versus* controls and ##p<0.01 *versus* Hx. (C-D) Secretion of the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β , C) and tumor necrosis factor- α (TNF- α , D) by pulmonary arteries in control rats (CTRL), after chronic hypoxia (Hx), after monocrotaline treatment (MCT), or in rats treated with MCT and exposed to 4 weeks of Hx (MCT+Hx). Cytokines were determined by ELISA (results expressed as pg cytokine/ml supernatant after 24h of incubation in the culture medium and presented as a percentage of cytokine secretion compared to controls). Data represent means \pm SEM with n=6 rats per group. **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* controls. For all experiments, determination of statistically significant differences was assessed with a one-way analysis of variance followed by a Dunn test.

Figure 2

Contractions of rat intrapulmonary arterial rings induced by cumulative concentrations of phenylephrine (PHE, 10^{-11} to 10^{-5} M, A), or of prostaglandin F 2α (PGF 2α , 10^{-9} to 10^{-4} M, B). Contractions were studied *ex vivo* after sacrifice at Day 28 in control rats (CTRL), after chronic hypoxia (Hx), after monocrotaline treatment (MCT), or after combination of MCT and 4 weeks of Hx (MCT+Hx). Results are expressed as the percentage of maximal contraction and are presented as means \pm SEM with n=12-15 rats per group. ***p<0.001 *versus* control concentration-response curves. Determination of statistically significant

differences between concentration-response curves was assessed with a two-way analysis of variance. ^{###} $p < 0.001$ versus Hx concentration-response curves. ^{\$\$\$} $p < 0.001$ versus MCT concentration-response curves. Values of $-\text{Log EC}_{50}$ (half maximal effective concentrations, means \pm SEM) are shown in Table C.

Figure 3

(A-D) Remodeling of rat pulmonary arteries (less than 50 μm in diameter) after chronic hypoxia (Hx), after monocrotaline treatment (MCT), or in rats treated with MCT and exposed to 4 weeks of Hx (MCT+Hx), compared to control rats (CTRL). A) Percentage of wall thickness. B) Representative cross-sectional views of remodeled pulmonary microarteries (1: CTRL; 2: Hx; 3: MCT; 4: MCT+Hx) showing medial thickening (hematoxylin and eosin staining). C) Luminal occlusion score. D) Representative cross-sectional views of remodeled pulmonary microarteries (1: CTRL; 2: Hx; 3: MCT; 4: MCT+Hx) showing luminal occlusion (van Gieson staining). For A) and C), results are presented as means \pm SEM with $n=7-11$ rats per group. Determination of statistically significant differences was assessed with a one-way analysis of variance followed by a Dunn test. ^{**} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$ versus control. ^{##} $p < 0.01$ versus Hx. ^{\$} $p < 0.05$ versus MCT. C) For B) and D), scale bars represent 10 μm .

(E) Representative cross-sectional views of lesions observed in small pulmonary arteries of rats treated with MCT and exposed to 4 weeks of Hx. 1-4: pulmonary arterial plexiform-like lesions (1-2: stalk-like lesions; 3-4: aneurysm-like lesions) (1: picro-Mallory staining; 2 and 4: hematoxylin and eosin staining; 3: van Gieson staining). 5: pulmonary arterial thrombotic lesion (Picro-Mallory staining). 6: pulmonary arterial eccentric lesion (hematoxylin and eosin staining). 7-8: concentric cellular neointimal lesions in pulmonary microarteries (7: α -smooth muscle actin and 8: von Willebrand factor immunostainings). Scale bars represent 20 μm .

Fig. 1

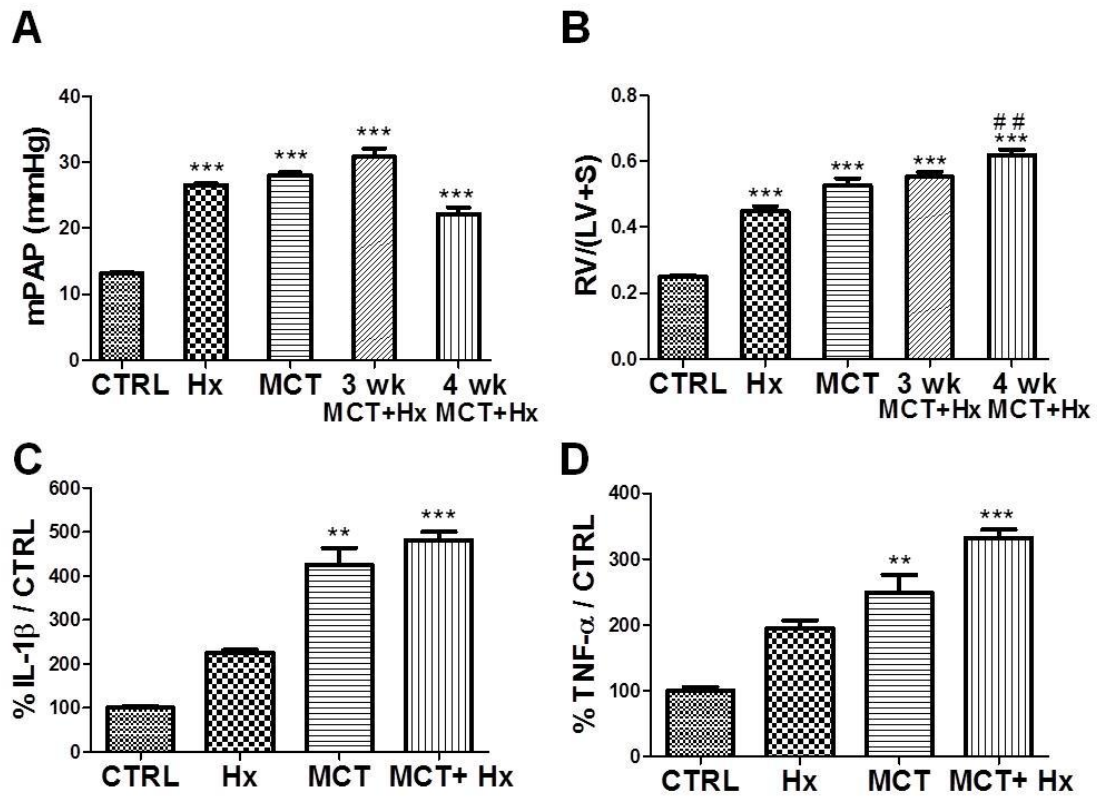
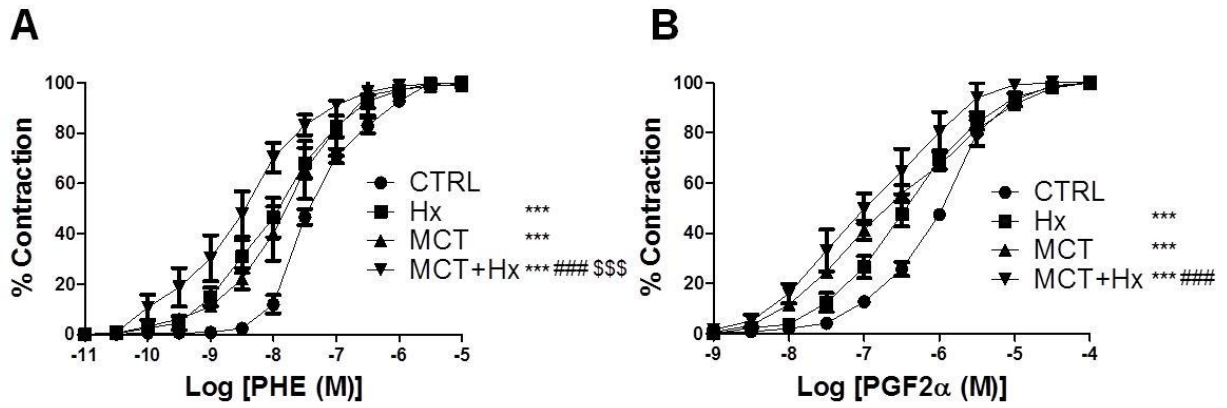


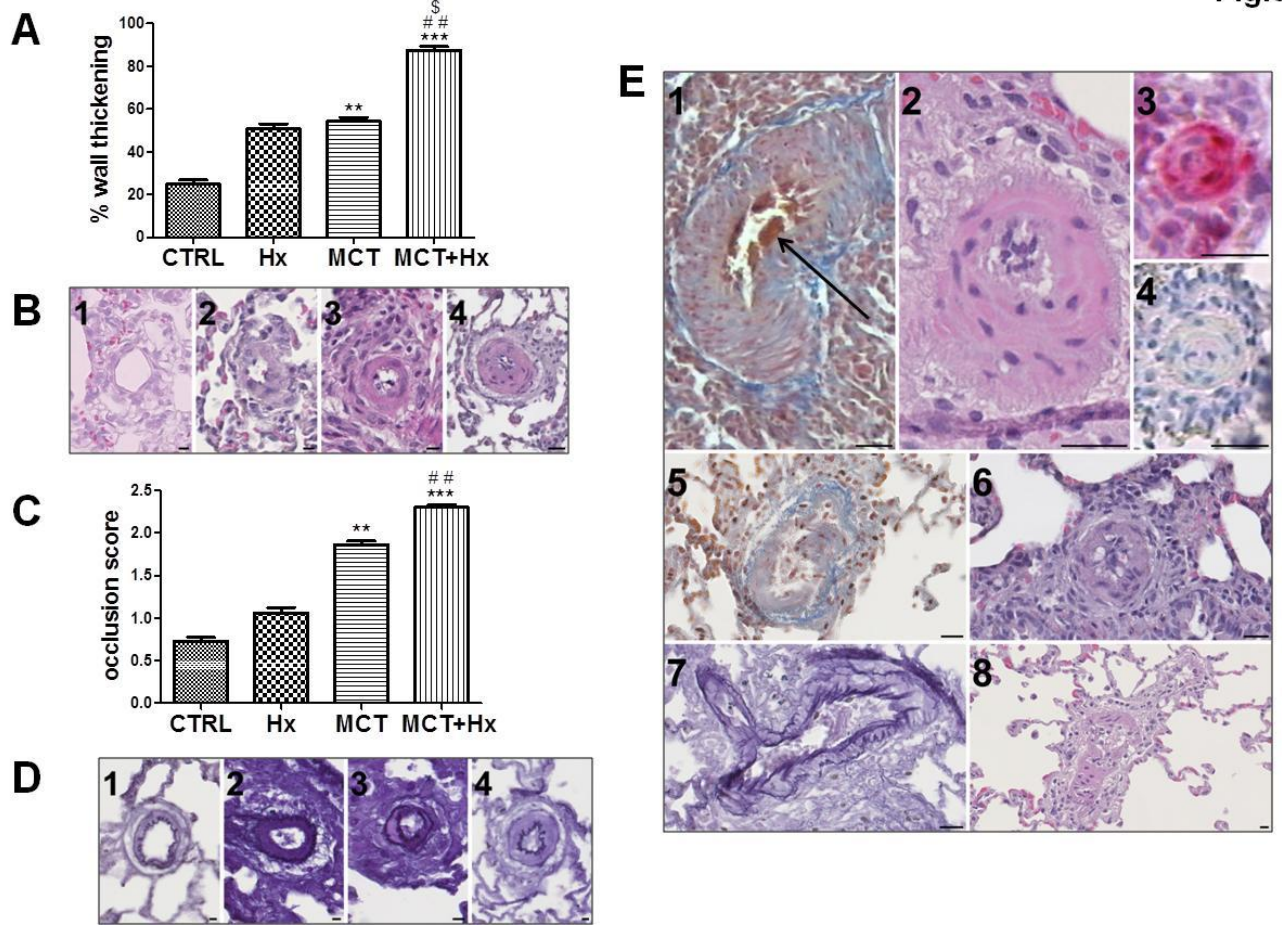
Fig. 2



C

	-Log EC₅₀		
	Mean	SEM	
PHE	CTRL	7.4	0.03
	Hx	8.0	0.06
	MCT	7.8	0.09
	MCT+Hx	8.5	0.09
PGF2α	CTRL	6.0	0.03
	Hx	6.4	0.05
	MCT	6.7	0.05
	MCT+Hx	6.9	0.09

Fig.3



Publication n°4

« Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of
Experimental Pulmonary Hypertension »

Véronique Freund-Michel, Marcelina Cardoso Dos Santos, Christophe Guignabert,
David Montani, Carole Phan, **Florence Coste**, Ly Tu, Mathilde Dubois,
Barbara Girerd, Arnaud Courtois, Marc Humbert, Jean-Pierre Savineau,
Roger Marthan et Bernard Muller

American journal of respiratory and critical care medicine 2015 ; 192 (3) : 342-55

(avec éditorial associé)

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie conduisant à une insuffisance cardiaque droite et entraînant à terme le décès des patients. En absence de traitement curatif, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est essentielle au développement de nouveaux traitements. Les facteurs de croissance jouent un rôle dans le développement de l'HTP et leur ciblage pourrait ouvrir vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette optique, nous avons évalué le facteur de croissance des nerfs (NGF) comme nouvelle cible thérapeutique dans l'HTP.

L'expression du NGF et l'expression et/ou l'activation de ses récepteurs ont été évaluées dans deux modèles classiques d'HTP chez le rat, après exposition à l'hypoxie chronique (Hx) ou traitement par la monocrotaline (MCT), ainsi que dans des échantillons humains provenant de patients souffrant d'HTAP idiopathique ou d'HTP associée à une BPCO. Les effets du NGF exogène ont été évalués *ex vivo* sur l'inflammation et la contraction des artères pulmonaires, et *in vitro* sur la prolifération et la migration des cellules vasculaires pulmonaires humaines. Les effets de l'inhibition du NGF ont été évalués *in vivo* dans les deux modèles d'HTP chez le rat (Hx ou MCT) à l'aide d'anticorps bloquants anti-NGF.

Nos résultats ont montré une augmentation de l'expression du NGF et/ou une augmentation de l'expression/activation de ses récepteurs dans l'HTP expérimentale et humaine. Les études *ex vivo/in vitro* ont pu mettre en évidence la capacité du NGF à induire la prolifération et la migration cellulaire, l'hyperréactivité artérielle pulmonaire, et

l'augmentation de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, *in vitro* par les cellules vasculaires pulmonaires en culture ou *ex vivo* par les artères pulmonaires isolées. *In vivo*, nos résultats ont montré un effet préventif et curatif des anticorps bloquants anti-NGF dans l'HTP chez le rat, en inhibant l'hyperréactivité artérielle pulmonaire, le remodelage et l'inflammation des artères pulmonaires.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats démontre un rôle important du NGF dans la physiopathologie de l'HTP et suggère que ce facteur de croissance pourrait être une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans cette pathologie.

<http://www.atsjournals.org.gate2.inist.fr/doi/10.1164/rccm.201410-1851OC#.V4zWLKlpxVc>

Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental Pulmonary Hypertension

Véronique Freund-Michel^{1,2}, Marcelina Cardoso Dos Santos^{1,2}, Christophe Guignabert^{3,4}, David Montani^{3,4,5}, Carole Phan^{3,4}, Florence Coste^{1,2,6}, Ly Tu^{3,4}, Mathilde Dubois^{1,2}, Barbara Girerd^{3,4,5}, Arnaud Courtois^{1,2}, Marc Humbert^{3,4,5}, Jean-Pierre Savineau^{1,2}, Roger Marthan^{1,2,6}, and Bernard Muller^{1,2}

¹University Bordeaux and ²INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, Bordeaux, France; ³Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; ⁴INSERM UMR-S 999, LabEx LERMIT, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; ⁵Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, DHU Thorax Innovation, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; and ⁶CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

Abstract

Rationale: Pulmonary hypertension (PH) is characterized by a progressive elevation in mean pulmonary arterial pressure, often leading to right ventricular failure and death. Growth factors play significant roles in the pathogenesis of PH, and their targeting may therefore offer novel therapeutic strategies in this disease.

Objectives: To evaluate the nerve growth factor (NGF) as a potential new target in PH.

Methods: Expression and/or activation of NGF and its receptors were evaluated in rat experimental PH induced by chronic hypoxia or monocrotaline and in human PH (idiopathic or associated with chronic obstructive pulmonary disease). Effects of exogenous NGF were evaluated *ex vivo* on pulmonary arterial inflammation and contraction, and *in vitro* on pulmonary vascular cell proliferation, migration, and cytokine secretion. Effects of NGF inhibition were

evaluated *in vivo* with anti-NGF blocking antibodies administered both in rat chronic hypoxia- and monocrotaline-induced PH.

Measurements and Main Results: Our results show increased expression of NGF and/or increased expression/activation of its receptors in experimental and human PH. *Ex vivo/in vitro*, we found out that NGF promotes pulmonary vascular cell proliferation and migration, pulmonary arterial hyperreactivity, and secretion of proinflammatory cytokines. *In vivo*, we demonstrated that anti-NGF blocking antibodies prevent and reverse PH in rats through significant reduction of pulmonary arterial inflammation, hyperreactivity, and remodeling.

Conclusions: This study highlights the critical role of NGF in PH. Because of the recent development of anti-NGF blocking antibodies as a possible new pain treatment, such a therapeutic strategy of NGF inhibition may be of interest in PH.

Keywords: pulmonary circulation; animal disease models; blocking antibodies

Pulmonary hypertension (PH) is characterized by a progressive increase in pulmonary vascular resistance, leading to sustained elevated mean pulmonary arterial

pressure (mPAP) over 25 mm Hg at rest and development of right heart failure (1, 2). Because current therapies slow the progression of the disease but still do not

afford a cure, new therapeutic strategies are required (3).

The pathologic key features of PH occur in small pulmonary arteries and include

(Received in original form October 15, 2014; accepted in final form April 18, 2015)

Supported by grants from INSERM, Fondation de France (2008002719), and Agence Nationale de la Recherche (ANR06 Physio 015 01).

Author Contributions: V.F.-M. conceived, initiated, and designed the study. V.F.-M., M.C.D.S., C.G., M.D., A.C., and B.M. participated in the planning, design, and interpretation of experiments. M.D. and A.C. performed contraction experiments. C.P. and L.T. performed Western blotting and ELISA experiments on patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension samples. V.F.-M., M.C.D.S., and F.C. performed the other experiments. D.M., B.G., C.G., C.P., L.T., and M.H. provided human idiopathic pulmonary arterial hypertension patients' samples. C.G., D.M., M.H., R.M., J.-P.S., and B.M. dispensed advice on data interpretation and provided help with it. V.F.-M. wrote the manuscript and prepared the figures. C.G., D.M., M.H., R.M., J.-P.S., and B.M. contributed to the preparation and the revision of the manuscript.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Véronique Freund-Michel, Pharm.D., Ph.D., INSERM U1045, Laboratoire de Pharmacologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, Case 83, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: veronique.michel@u-bordeaux.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 192, Iss 3, pp 342–355, Aug 1, 2015

Copyright © 2015 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201410-1851OC on June 3, 2015

Internet address: www.atsjournals.org

At a Glance Commentary

Scientific Knowledge on the

Subject: Pulmonary hypertension (PH) is a rare but life-threatening disease. Because current therapies remain essentially palliative and do not afford a cure, new therapeutic strategies are required. Pathologic key features of PH occur in small pulmonary arteries and include inflammation, altered vasomotricity, and pulmonary arterial wall remodeling. Many growth factors have been implicated in these events. To identify new therapeutic targets in PH, we focused our attention on the nerve growth factor (NGF), an essential growth factor for neurons, which is produced by lung cells and associated with the development of various pathologic conditions affecting the lung. However, its potential role in PH is unknown.

What This Study Adds to the

Field: Our present study shows increased NGF expression and/or increased expression/activation of its receptors in experimental and human PH. Moreover, it highlights critical roles of NGF in the development and the progression of this disease. Using two well-established animal models of PH, we demonstrate that NGF inhibition with anti-NGF blocking antibodies prevents and reverses PH in rats via its effects on inflammation, pulmonary arterial vasoconstriction, and remodeling. Because NGF inhibition by blocking antibodies is already evaluated as a possible new therapeutic strategy in the treatment of pain, our present work demonstrates that such NGF targeting may offer novel therapeutic perspectives in PH.

inflammation, altered vasomotricity, and remodeling with in particular increased smooth muscle and endothelial cell proliferation and migration (4–6). Growth factors play a major role in these cellular events (7). For instance, platelet-derived growth factor (8, 9) or fibroblast growth factor-2 (10, 11) have been implicated in the pathogenesis of experimental and human PH.

In this context, we focused our attention on the nerve growth factor (NGF), which belongs to the neurotrophin family and is an essential growth factor for neuronal development, survival, and differentiation (12). However, NGF also plays physiologic and pathophysiologic roles outside the nervous system (13). NGF and its receptors, both the picomolar high-affinity tropomyosin-related kinase A (TrkA) and the nanomolar low-affinity p75^{NTR} receptors, are expressed in pulmonary arteries (14). In the airways, NGF stimulates proliferation (15) and migration of human airway smooth muscle cells (16) and migration of human lung fibroblasts (17). In addition, NGF is also a proinflammatory mediator in the airways and participates in bronchial hyperresponsiveness (18). Therefore, we hypothesized that NGF may contribute to pulmonary arterial remodeling, inflammation, and altered reactivity in PH. Thus, we evaluated NGF and NGF receptor expression/activation in experimental PH induced in the rat by chronic hypoxia (CH) or monocrotaline (MCT) exposure, as well as in human PH, either idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) or associated with chronic obstructive pulmonary disease (PH-COPD). Then we determined whether exogenous NGF would be able to reproduce *ex vivo* or *in vitro* some pathophysiologic aspects of PH. Finally, we conducted experiments in rats to determine whether anti-NGF blocking antibodies administered *in vivo* prevented and/or reversed pulmonary arterial hyperreactivity, remodeling, and inflammation in CH- or MCT-induced PH. Some of the results of these studies have been previously reported in the form of abstracts (19–23).

Methods

Further details and full description of all methods are given in the online supplement.

Human Materials

Control lung tissues were obtained from 10 patients (control patients) undergoing surgery for lung carcinoma. A preoperative echocardiography was performed for each patient to rule out the presence of PH. After lobectomy and transport in sterile physiologic solution, lung samples, distant from the malignant lesion, were dissected by a pathologist. The absence of tumoral infiltration was retrospectively established in all tissue sections by the histopathologic analysis. Lung tissues were also obtained from five patients with PH-COPD and

12 patients with IPAH, all undergoing lung transplantation. PH was confirmed in all patients by right heart catheterization. The study was approved by local ethics committees (Comité de Protection des Personnes, Sud-Ouest et Outre-mer III, Bordeaux, France; and Comité de Protection des Personnes, Ile de France VII, Le Kremlin Bicêtre, France). Informed consent was obtained from each individual patient.

Human Pulmonary Arterial Cell Cultures

Human pulmonary arterial smooth muscle cells (hPASMCs) were obtained as previously described (24). Human pulmonary arterial endothelial cells (hPAECs; Promocell, Heidelberg, Germany) were cultured according to the manufacturer's instructions. The online supplement provides further details.

Animal Experiments

All animal studies were performed according to approved institutional protocols. Adult male Wistar rats (300–350 g; Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France) were randomly divided into control, control-treated, PH, and PH-treated groups (n = 4–12 rats per group). PH was induced by either exposing rats to CH in a controlled hypobaric chamber (380 mm Hg) for 28 days, or with a single intraperitoneal MCT injection (60 mg/kg; Sigma-Aldrich). In both preventive and curative protocols, control-treated and PH-treated groups received either nonrelevant antibodies (10 µg/kg intraperitoneally, normal rabbit polyclonal IgG; Millipore, Molsheim, France) or rabbit polyclonal anti-NGF blocking antibodies (10 µg/kg intraperitoneally; Millipore). The online supplement provides further details.

Statistical Analysis

All data are reported as mean ± SEM of N independent observations. Two-way analysis of variance was used to compare concentration–response curves. For all other parameters, one-way analysis of variance was used to assess differences among groups, followed by adapted *post hoc* tests (Mann-Whitney test when comparing two groups, Dunn test when comparing more than two groups). All data were analyzed using GraphPad Prism software v6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). *P* less than 0.05 was considered significant.

Results

Expression of NGF and/or Expression/Activation of Its Receptors Are Increased in Experimental and Human PH

In pulmonary arteries from patients with PH-COPD, both NGF secretion (Figure 1A) and protein expression (Figure 1B) were significantly increased compared with control patients ($P < 0.05$ for both). Consistent with these findings, immunohistochemistry showed a strong

NGF staining in the endothelial layer of PH-COPD pulmonary arteries (Figure 1C). By contrast, in patients with IPAH, no differences in NGF serum levels or in lung protein expression were observed compared with control subjects (Figures 1D and 1E). In animal models of PH, NGF secretion by pulmonary arteries was significantly increased in both CH-exposed ($P < 0.05$) and MCT-challenged rats ($P < 0.001$) compared with control rats (Figure 1F). NGF protein expression was also significantly increased in pulmonary arteries from

CH-exposed ($P < 0.05$) (Figure 1G) and MCT-challenged rats ($P < 0.01$) (Figure 1H) compared with control animals. Increased expression of NGF was also evidenced by immunohistochemistry in CH-exposed and MCT-challenged rats (Figure 1I).

Protein expression of both TrkA and p75^{NTR} receptors was detected in pulmonary arteries from control patients and from control rats (Figure 2). Expression of the TrkA receptor was modified neither in patients with PH-COPD nor in patients with IPAH

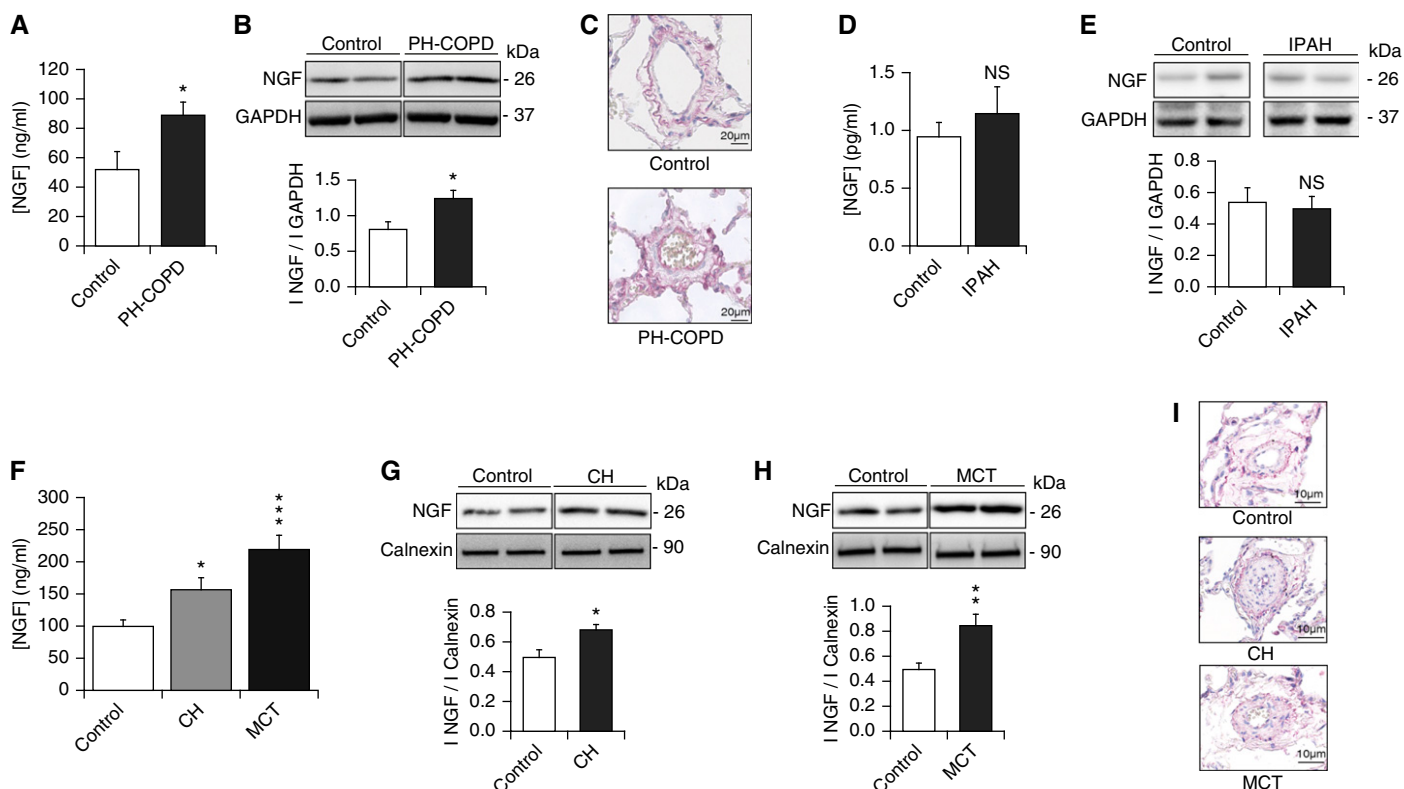


Figure 1. Nerve growth factor (NGF) secretion and expression in experimental and human pulmonary hypertension (PH). (A) NGF protein levels secreted by whole pulmonary arteries from patients with PH associated with chronic obstructive pulmonary disease (PH-COPD) compared with control patients. NGF was determined by ELISA (results expressed as ng NGF/ml supernatant after 24 h of incubation in the culture medium). Data represent means \pm SEM. $n = 5$ patients per group. * $P < 0.05$ versus control subjects. (B) Expression of NGF assessed by Western blot analysis in pulmonary arteries from patients with PH-COPD compared with control patients. Immunoblots are representative of $n = 5$ patients per group, showing identical results. Results are normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and quantification of NGF expression is shown in the *bar graphs*. Data represent means \pm SEM. * $P < 0.05$ versus control subjects. (C) NGF localization assessed by immunohistochemistry in human pulmonary arteries from patients with PH-COPD compared with control patients. Stainings are representative of $n = 5$ patients in each group. (D) Circulating NGF protein levels in serum from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) compared with control patients. NGF was determined by ELISA (results expressed as pg NGF/ml serum). Data represent means \pm SEM. $n = 10$ –12 patients per group. (E) Expression of NGF assessed by Western blot analysis in whole-lung homogenates from patients with IPAH compared with control patients. Immunoblots are representative of $n = 10$ –12 patients per group, showing identical results. Results are normalized to GAPDH and quantification of NGF expression is shown in the *bar graphs*. Data represent means \pm SEM. (F) NGF protein levels secreted by whole rat pulmonary arteries in experimental PH induced either by chronic hypoxia (CH) or monocrotaline (MCT) compared with control rats. NGF was determined by ELISA (results expressed as ng NGF/ml supernatant after 24 h of incubation in the culture medium). Data represent means \pm SEM. $n = 12$ rats per group. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus control rats. (G and H) Expression of NGF assessed by Western blot analysis in pulmonary arteries from rats with PH induced by CH (G) and MCT (H), compared with control rats. Immunoblots are representative of $n = 6$ rats per group, showing identical results. Results are normalized to calnexin, and quantification of NGF expression is shown in the *bar graphs*. Data represent means \pm SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control rats. (I) NGF localization assessed by immunohistochemistry in pulmonary arteries from rats with PH induced either by CH or by MCT, compared with control animals. Stainings are representative of $n = 6$ rats in each group. NS = not statistically significant versus control subjects.

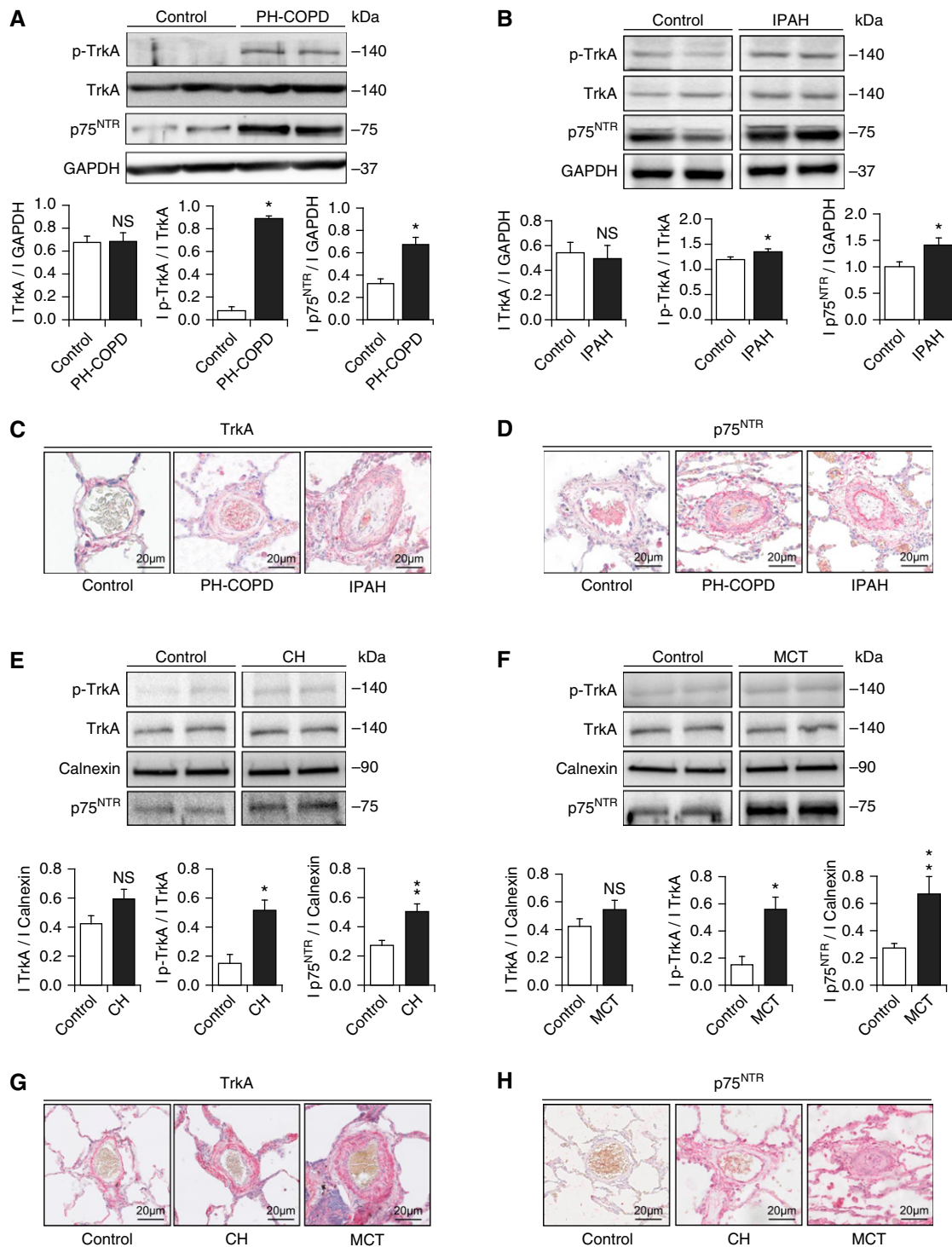


Figure 2. Expression and/or activity of nerve growth factor (NGF) receptors in experimental and human pulmonary hypertension (PH). (A and B) Expression of tropomyosin-related kinase A (TrkA) and p75^{NTR} receptors assessed by Western blot analysis in pulmonary arteries from patients with PH associated with chronic obstructive pulmonary disease (PH-COPD) (A) and in whole-lung homogenates from patients with idiopathic pulmonary hypertension (IPAH) (B), compared with control patients. TrkA phosphorylation (p-TrkA) was also assessed. Immunoblots are representative of $n = 5-12$ patients per group, showing identical results. Results are normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and quantification of NGF receptor expression or phosphorylation is shown in the *bar graphs*. Data represent means \pm SEM. * $P < 0.05$ versus control patients. (C and D) Localization of TrkA (C) and p75^{NTR} (D) receptors assessed by immunohistochemistry in human pulmonary arteries from PH-COPD or patients with IPAH, compared with control patients. Stainings are representative of $n = 5-6$ patients in each group. (E and F) Expression of TrkA and p75^{NTR} receptors assessed by Western blot analysis in pulmonary arteries from rats with PH induced by chronic hypoxia (CH) (E) and monocrotaline (MCT) (F), compared

compared with control patients (Figures 2A–2C). However, expression of the phosphorylated TrkA receptor (on tyrosine residues) and of the p75^{NTR} receptor was significantly increased in both patients with PH-COPD and patients with IPAH compared with control subjects (Figures 2A, 2B, and 2D). Consistently, in rat experimental PH, a similar pattern of TrkA and p75^{NTR} protein expression was observed: no changes in TrkA expression but increased expressions of the TrkA phosphorylated form and of the p75^{NTR} receptor were observed in pulmonary arteries from CH-exposed and MCT-challenged rats compared with control animals (Figures 2E–2H).

Exogenous NGF Induces Pulmonary Arterial Hyperreactivity and Stimulates Pulmonary Vascular Cell Proliferation, Migration, and Secretion of Proinflammatory Cytokines

NGF by itself (up to 1 µg/ml) did not modify the basal tone of pulmonary arteries *ex vivo*. Pulmonary arterial relaxation to nitric oxide-dependent or -independent agents was not significantly modified in the presence of NGF (0–100 ng/ml, data not shown). By contrast, in the presence of NGF (100 ng/ml, 1 h of pretreatment), pulmonary arterial contraction to phenylephrine (PHE) (Figure 3A) or to prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) (Figure 3B) was increased. Concentration–response curves were significantly shifted toward the left compared with control animals ($P < 0.01$ and $P < 0.05$ for PHE and PGF_{2α}, respectively). Similar results were observed in pulmonary arteries from control patients with NGF pretreatment significantly increasing contractions to PHE ($P < 0.01$) or to PGF_{2α} ($P < 0.05$) (Figures 3C and 3D).

In addition, exogenous NGF induced proliferation of hPASMCs and hPAECs *in vitro* (Figure 4). NGF proliferative effect was maximal in hPASMCs at 0.1 ng/ml ($P < 0.01$), and decreased at higher concentrations (Figure 4A). This effect was abolished when inhibiting the TrkA

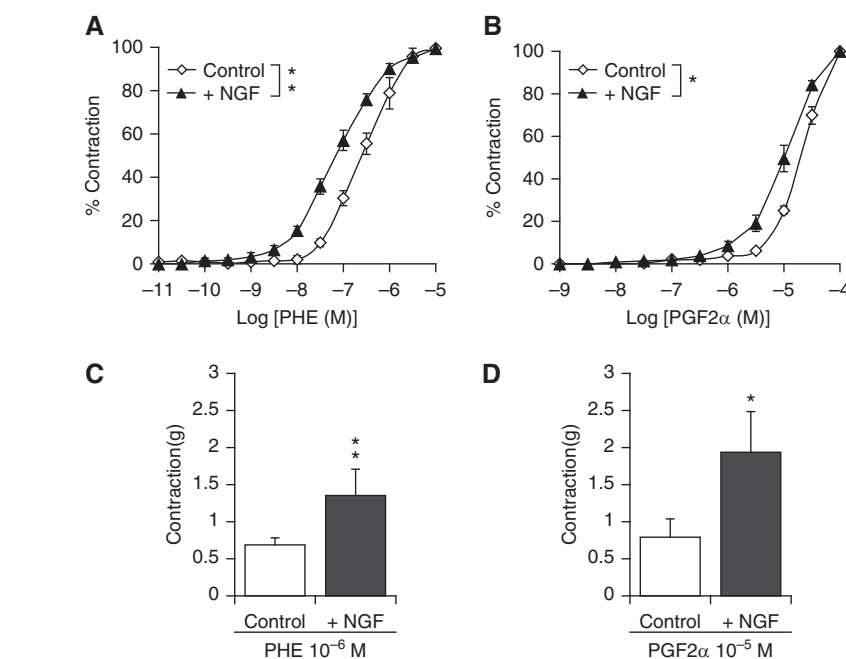


Figure 3. Effect of exogenous nerve growth factor (NGF) on rat and human pulmonary arterial reactivity. (A and B) Contractions of rat intrapulmonary arterial rings induced by cumulative concentrations of either phenylephrine (PHE; 10^{-11} to 10^{-5} mol/L) (A) or prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}; 10^{-9} to 10^{-4} mol/L) (B). Experiments were conducted in the absence (open diamonds) or presence (solid triangles) of NGF (100 ng/ml, 1 h of pretreatment). Results are expressed as the percentage of maximal contraction and are presented as means \pm SEM. $n = 12$ rats per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control concentration–response curves. (C and D) Contractions of human intrapulmonary arterial rings induced by a single concentration of either PHE (10^{-6} mol/L) (C) or PGF_{2α} (10^{-5} mol/L) (D). Experiments were conducted in the absence (open bars) or presence (solid bars) of NGF (100 ng/ml, 1 h of pretreatment). Results are expressed as contractions in grams. Data represent means \pm SEM. $n = 4$ patients per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control subjects.

receptor ($P < 0.001$), the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ($P < 0.001$), or the extracellular regulated-kinase (ERK) pathway ($P < 0.001$) (Figure 4A). In hPAECs, NGF proliferative effect was concentration-dependent ($P < 0.001$) and was partially blocked when inhibiting TrkA ($P < 0.05$) or p75^{NTR} receptors ($P < 0.05$). Concomitant inhibition of TrkA and p75^{NTR} receptors totally abolished NGF proliferative effect in this cell type ($P < 0.001$) (Figure 4B). In addition, NGF-induced proliferation of hPAECs was also abolished by inhibitors of atypical protein kinase Cs (PKCs) ($P < 0.001$) or of the transcription factor nuclear factor (NF)- κ B ($P < 0.001$) (Figure 4B). These results therefore show that NGF induces

proliferation of hPASMCs through TrkA-mediated activation of PI3K and ERK pathways, whereas NGF-induced proliferation of hPAECs requires both TrkA and p75^{NTR} receptors as well as the activation of distinct intracellular signaling pathways (i.e., atypical PKCs and the transcription factor NF- κ B). NGF also stimulated migration of both hPASMCs and hPAECs in a concentration-dependent manner ($P < 0.001$ for both) (see Figure E1 in the online supplement).

Finally, NGF (100 ng/ml, 24 h) increased the secretion of the proinflammatory cytokines IL-1 β ($P < 0.01$) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.001$) by control rat pulmonary arteries. Similar results were obtained in

Figure 2. (Continued). with control rats. p-TrkA was also assessed. Immunoblots are representative of $n = 6$ rats per group, showing identical results. Results are normalized to calnexin, and quantification of NGF receptor expression or phosphorylation is shown in the bar graphs. Data represent means \pm SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control rats. (G and H) Localization of TrkA (G) and p75^{NTR} (H) receptors assessed by immunohistochemistry in pulmonary arteries from rats with PH induced either by CH or by MCT, compared with control rats. Stainings are representative of $n = 6$ rats in each group. NS = not statistically significant versus control subjects.

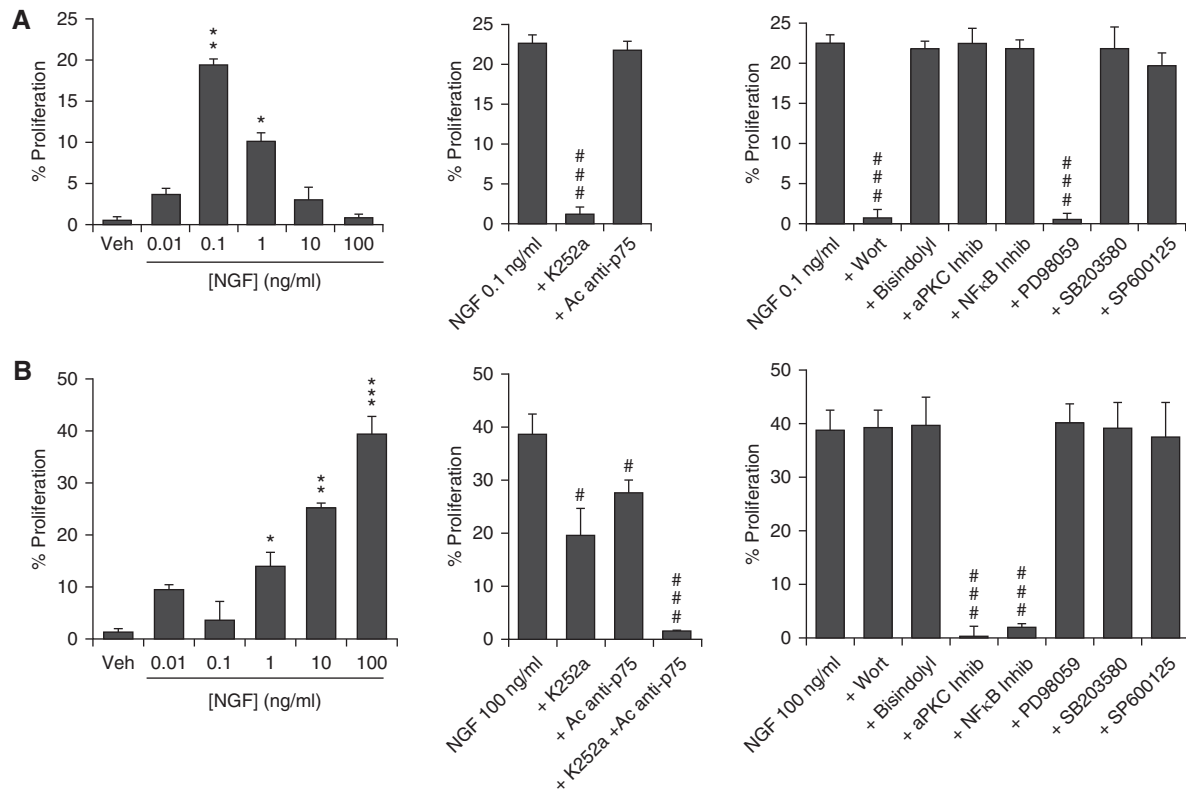


Figure 4. Proliferative effect of exogenous nerve growth factor (NGF) *in vitro* (0.01–100 ng/ml, 24 h) on human pulmonary arterial smooth muscle cells (A) or human pulmonary arterial endothelial cells (B). NGF receptors involved were identified through pretreatment (1 h) with the tropomyosin-related kinase A tyrosine-kinase inhibitor K252a (300 nM) or with an anti-p75^{NTR} blocking antibody (10 μg/ml). NGF signaling pathways involved were identified through pretreatment (1 h) with the following inhibitors: wortmannin (Wort; 100 nM, inhibiting the phosphoinositide 3-kinase), bisindolylmaleimide I (Bisindolyl; 1 μM, inhibiting conventional protein kinase Cs), PKCζ/ι pseudosubstrate inhibitor (aPKC Inhib; 10 μM, inhibiting PKCζ and PKCι atypical protein kinase Cs), nuclear factor (NF)-κB activation inhibitor (NF-κB Inhib; 100 nM, inhibiting the NF-κB), PD98059 (10 μM, inhibiting the ERK 1/2 pathway), SB203580 (2 μM, inhibiting the p38 MAP-kinase), or SP600125 (1 μM, inhibiting the JNK MAP-kinase). Data are expressed as a percentage of proliferation compared with untreated control cells and are presented as means ± SEM. n = 5 independent experiments performed in triplicate in each group. Veh = NGF vehicle. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 versus untreated control cells; #*P* < 0.05 and ###*P* < 0.001 versus cells treated with NGF (0.1 or 100 ng/ml).

pulmonary arteries from control patients with NGF inducing increased secretion of IL-1β (*P* < 0.01) and of TNF-α (*P* < 0.05) (Figure 5A). NGF also stimulated IL-1β and TNF-α secretion from both hPASCs and hPAECs, with a maximal effect obtained at 0.1 ng/ml of NGF in hPASCs (see Figure E2A), and at 100 ng/ml in hPAECs (see Figure E2B). In hPASCs, NGF-induced IL-1β and TNF-α secretions were both abolished by inhibition of the TrkA receptor (*P* < 0.05) (Figure 5B). NGF-induced IL-1β secretion was totally blocked by inhibitors of PI3K (*P* < 0.05) or of the ERK MAP-kinase pathway (*P* < 0.05). NGF-induced TNF-α secretion was abolished by inhibitors of conventional PKCs (*P* < 0.05), of the transcription factor NF-κB (*P* < 0.05), or of the p38 MAP-kinase (*P* < 0.05) (Figure 5A). In hPAECs, NGF-induced IL-1β and TNF-α secretions were both abolished by inhibition of the

p75^{NTR} receptor (*P* < 0.05), of conventional PKCs (*P* < 0.05), of the transcription factor NF-κB (*P* < 0.05), and of the p38 MAP-kinase (*P* < 0.05) (Figure 5C). These results therefore indicate that in hPASCs, NGF-induced secretions of both cytokines is mediated by the TrkA receptor, with distinct intracellular signaling pathways for IL-1β and TNF-α (for IL-1β, TrkA activates PI3K and ERK pathways; for TNF-α, TrkA activates conventional PKCs, p38, and NF-κB pathways). In hPAECs, both IL-1β and TNF-α secretions are mediated by the p75^{NTR} receptor, which activates conventional PKCs, p38, and NF-κB pathways.

Altogether, these *ex vivo* and *in vitro* results indicate that NGF may contribute to pulmonary arterial altered reactivity and remodeling occurring in PH, and that NGF may also play a role in inflammation

associated with PH. To validate these findings, we subsequently studied whether anti-NGF blocking antibodies administered *in vivo* would prevent and/or reverse experimental PH.

Anti-NGF Blocking Antibodies Decrease mPAP and Right Ventricular Hypertrophy in Experimental PH

Preventive protocols were conducted during 28 days, with antibodies administered from the beginning of the protocols (see Figures E3A and E3B). Curative protocols were also conducted during 28 days, but with antibodies administered only during the last 2 weeks (see Figures E3C and E3D).

PH development was evidenced by a significant increase in mPAP (*P* < 0.001) (Figures 6A and 6B) and by a right ventricular hypertrophy (Fulton index, *P* < 0.001) (Figures 6C and 6D) compared with control subjects. Preventive or curative

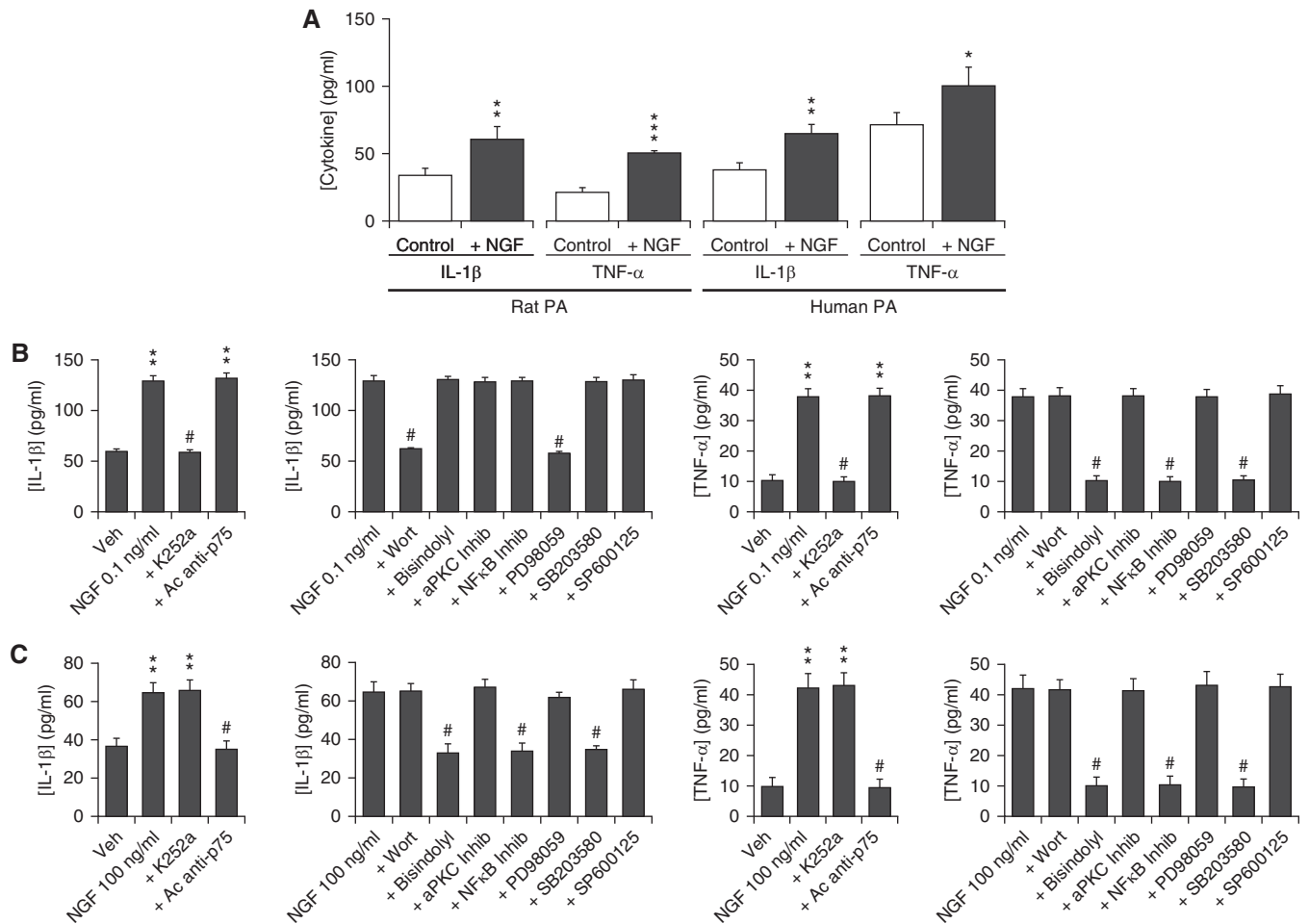


Figure 5. Effect of exogenous nerve growth factor (NGF) *ex vivo* and *in vitro* on secretion of inflammatory cytokines. (A) Secretions of the proinflammatory cytokines IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by rat or human pulmonary arteries (PA), in the absence (*open bars*) or presence (*solid bars*) of NGF (100 ng/ml, 24 h). Cytokines were determined by ELISA (results expressed as pg cytokine/ml supernatant after 24 h of incubation in the culture medium). Data represent means \pm SEM. $n = 12$ rats or $n = 4$ patients per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus control subjects. (B and C) Secretions of IL-1 β and TNF- α induced by NGF (0.1 or 100 ng/ml, 24 h) in human pulmonary arterial smooth muscle cells (B) or human pulmonary arterial endothelial cells (C). NGF receptors involved were identified through pretreatment (1 h) with the tropomyosin-related kinase A tyrosine-kinase inhibitor K252a (300 nM) or with an anti-p75^{NTR} blocking antibody (10 μ g/ml). NGF signaling pathways involved were identified through pretreatment (1 h) with the following inhibitors: wortmannin (Wort; 100 nM, inhibiting the phosphoinositide 3-kinase), bisindolylmaleimide I (Bisindolyl; 1 μ M, inhibiting conventional protein kinase Cs), PKC ζ / ι pseudosubstrate inhibitor (aPKC Inhib; 10 μ M, inhibiting the atypical PKC ζ and PKC ι protein kinase Cs), nuclear factor (NF)- κ B activation inhibitor (NF- κ B Inhib; 100 nM, inhibiting the NF- κ B), PD98059 (10 μ M, inhibiting the ERK 1/2 pathway), SB203580 (2 μ M, inhibiting the p38 MAP-kinase), or SP600125 (1 μ M, inhibiting the JNK MAP-kinase). Cytokines were determined by ELISA (results expressed as pg cytokine/ml supernatant after 24 h of incubation). Data represent means \pm SEM. $n = 5$ independent experiments performed in triplicate in each group. Veh = NGF vehicle. ** $P < 0.01$ versus untreated control cells; # $P < 0.05$ versus cells treated with NGF (0.1 or 100 ng/ml).

treatment with nonrelevant antibodies did not affect values of mPAP and of Fulton index. However, in both CH- and MCT-induced PH, animals preventively or curatively treated with anti-NGF blocking antibodies displayed lower mPAP (Figures 6A and 6B) and Fulton index values (Figures 6C and 6D). Our results therefore suggest that NGF is involved in both PH development and persistence. To better understand the beneficial effects of NGF inhibition in PH, we further investigated

the pathophysiologic mechanisms involved.

Anti-NGF Blocking Antibodies Decrease Pulmonary Arterial Hyperreactivity, Remodeling, and Inflammation in Experimental PH

Intrapulmonary arteries from CH-exposed (Figure 7A) or MCT-treated rats (Figure 7B) displayed hyperreactivity to PHE, with concentration-response curves significantly shifted toward the left

compared with control animals ($P < 0.01$ for both). Hyperreactivity to PGF_{2 α} was also observed in both PH rat models (see Figures E4A and E4B). Administration of nonrelevant antibodies had no significant effect on these shifts. By contrast, treatment with anti-NGF blocking antibodies partially reversed (curative protocol, $P < 0.05$) (Figures 7A and 7B) or totally prevented hyperreactivity to PHE (preventive protocol, $P < 0.01$) (see Figures E5A and E5B). Similar results were observed for

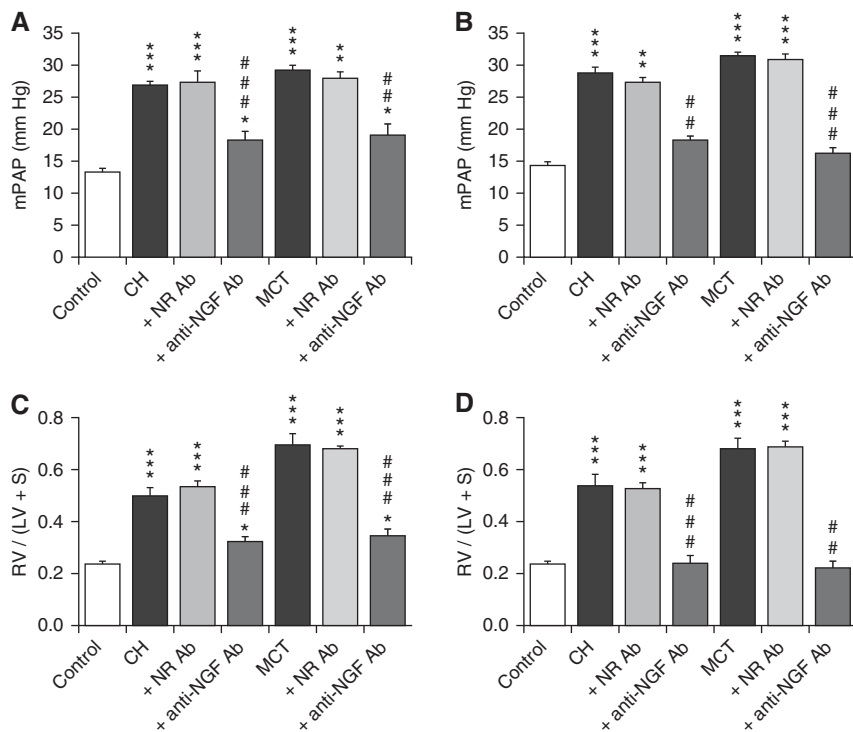


Figure 6. Prevention and reversal of increased mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and right ventricular hypertrophy by anti-nerve growth factor (NGF) blocking antibodies in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. (A and B) mPAP (in mm Hg) measured on Day 28 in control rats, after chronic hypoxia (CH) or after monocrotaline treatment (MCT), and in rats exposed to CH or to MCT and treated either preventively (A) or curatively (B) with nonrelevant (+ NR Ab) or with anti-NGF blocking (+ anti-NGF Ab) antibodies. Data represent means \pm SEM. $n = 8-12$ rats per group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$ versus control animals; $##P < 0.01$ and $###P < 0.001$ versus CH or MCT. (C and D) Right ventricular hypertrophy expressed as the Fulton index (= ratio of right ventricle weight [RV] to left ventricle plus septum weight [LV + S]) in the same experimental groups in preventive (C) or curative (D) protocols. Data represent means \pm SEM. $n = 8-12$ rats per group. $*P < 0.05$ and $***P < 0.001$ versus control animals; $##P < 0.01$ and $###P < 0.001$ versus CH or MCT.

PGF_{2 α} , with hyperreactivity to PGF_{2 α} being partially reversed in the curative protocol (see Figures E4A and E4B), and totally prevented in the preventive protocol (see Figures E5C and E5D).

Hyperreactivity to PHE was confirmed *in vivo* in both PH rat models by direct injection of PHE into the main pulmonary artery. In control rats, PHE induced a transient increase in mPAP (Figure 7C; see Figure E4C). No differences were observed in rats treated with anti-NGF blocking antibodies compared with control rats. PHE-induced increase in mPAP was significantly greater in CH-exposed ($P < 0.01$) or MCT-challenged rats ($P < 0.05$) than in control rats. This increase was significantly reduced in rats exposed to CH or to MCT and curatively treated with anti-NGF blocking antibodies ($P < 0.05$ for both) (Figure 7C; see Figure E4C). Therefore, both our *ex vivo* and *in vivo* data

strongly suggest a role for NGF in pulmonary arterial hyperreactivity during PH.

A role of NGF inhibition in pulmonary arterial remodeling *in vivo* was studied by quantitative analysis of medial wall thickness in intrapulmonary arterioles (external diameter $< 50 \mu\text{m}$). Compared with control subjects, this parameter was significantly increased in both CH-exposed and MCT-treated rats ($P < 0.01$ for both) (Figure 8). Administration of nonrelevant antibodies had no significant effect on this medial thickening. By contrast, administration of anti-NGF blocking antibodies partially reduced values of medial wall thickness in lungs of CH-exposed ($P < 0.05$) or of MCT-treated rats ($P < 0.01$). These results were confirmed by α -smooth muscle actin immunostaining, showing that anti-NGF blocking antibodies reduced accumulation

of pulmonary smooth muscle cells (Figure 8B). In the preventive protocol, medial thickening was totally prevented by administration of anti-NGF blocking antibodies in both CH-exposed and MCT-treated rats (see Figure E6A).

Finally, we studied the effects of NGF blockade on inflammation associated with PH. We showed that the secretion of proinflammatory cytokines by pulmonary arteries was significantly increased in CH-exposed or MCT-treated rats ($P < 0.001$) (Figure 9A). This increase was not significantly modified when rats were treated with nonrelevant antibodies, but was partially or totally reversed when rats were treated with anti-NGF blocking antibodies in the curative protocol ($P < 0.01$ or 0.001 vs. CH or MCT) (Figure 9A). In the preventive protocol, IL-1 β and TNF- α increased secretions were also partially or totally prevented in both CH-exposed and MCT-treated rats (see Figure E6C). Finally, the effects of NGF inhibition on the recruitment of inflammatory cells in lung tissues were also evaluated. After CH exposure or MCT challenge, Western blot analysis of lung homogenates showed increased protein expression of CD45, a marker of inflammatory cell infiltration in the lung parenchyma ($P < 0.01$) (Figure 9B). Treatment with nonrelevant antibodies had no significant effect on this parameter. By contrast, CD45-increased expression was totally reversed in CH-exposed rats and partially reversed in MCT-treated rats after administration of anti-NGF blocking antibodies (Figure 9B). Similar effects were observed in the preventive protocol (see Figure E6B).

Discussion

In this study, we describe for the first time an increase in expression of NGF and/or in expression/activation of its receptors in experimental and human PH, supporting a critical role for NGF and its signaling pathways in this disease. Experiments conducted *in vitro* and *ex vivo* demonstrated that NGF induces (1) hyperreactivity to vasoconstrictors in rat and human isolated pulmonary arteries, (2) proliferation and migration of hPASMCs and hPAECs, and (3) secretion of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α from rat and human isolated pulmonary arteries as well as from

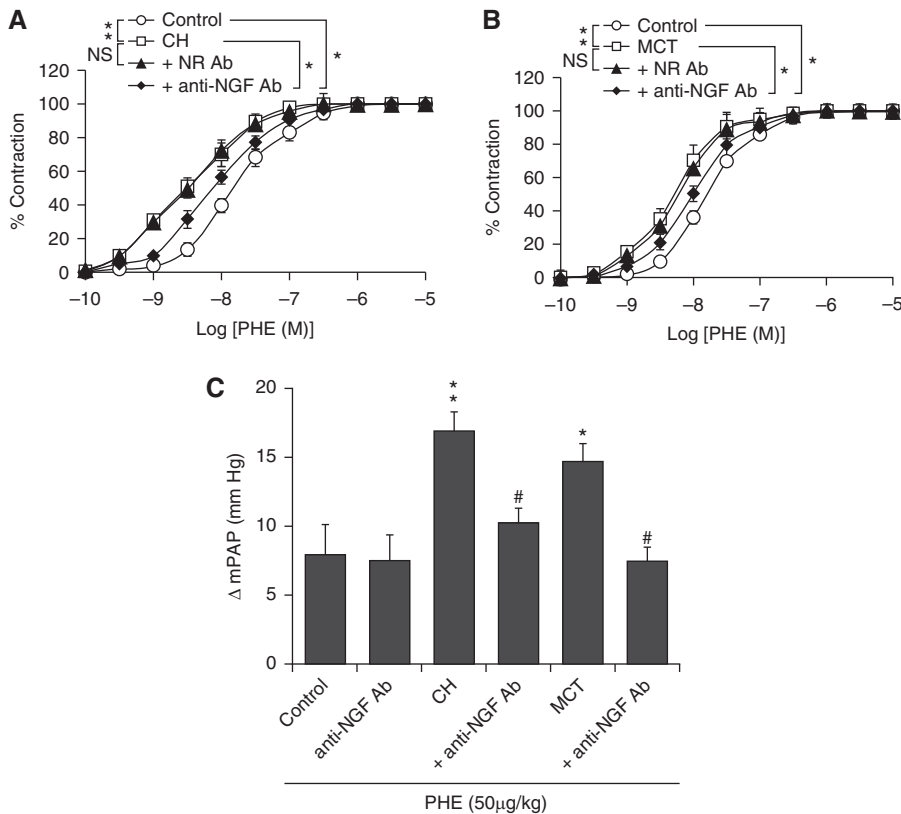


Figure 7. Reversal of pulmonary arterial hyperreactivity by anti-nerve growth factor (NGF) blocking antibodies in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. (A and B) *Ex vivo* contractions of rat intrapulmonary arterial rings induced by cumulative concentrations of phenylephrine (PHE; 10^{-10} to 10^{-5} mol/L). Contractions were studied after killing on Day 28 in control rats, after chronic hypoxia (CH), or after monocrotaline treatment (MCT), and in rats exposed to CH or to MCT and curatively treated with nonrelevant (+ NR Ab) or with anti-NGF blocking (+ anti-NGF Ab) antibodies. Data represent means \pm SEM. $n = 8$ – 12 rats per group. NS = not statistically significant; $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ versus control animals, CH or MCT concentration–response curves. (C) *In vivo* measurements of mean pulmonary arterial pressure variations (Δ mPAP in mm Hg) after direct injection of PHE ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$) in the main pulmonary artery. mPAP were measured on Day 28 in control rats, in rats treated with anti-NGF blocking antibodies (anti-NGF Ab), after CH or MCT treatment, and in rats exposed to CH or to MCT and curatively treated with anti-NGF blocking antibodies (+ anti-NGF Ab). Data represent means \pm SEM. $n = 4$ – 5 rats per group. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ versus control animals; $\#P < 0.05$ versus CH or MCT.

hPASMCs and hPAECs. In addition, *in vivo* experiments showed that NGF inhibition by anti-NGF blocking antibodies administered to CH-exposed or MCT-challenged rats not only prevents but also reverses PH. In these *in vivo* experiments, NGF inhibition decreased pulmonary vascular remodeling and limited pulmonary arterial hyperreactivity and inflammation. Therefore, our findings suggest that NGF may represent a target of particular interest in future PH therapeutic strategy.

In this study, NGF and its receptors were expressed in pulmonary arteries from control rats or from control patients, in accordance with the literature (14, 25) and with previous results from our group (26).

We show here that NGF expression was increased in pulmonary arteries in experimental PH induced by either CH exposure or MCT challenge. Such overexpression was confirmed in patients with PH-COPD, but not in patients with IPAH. Although an increase in NGF expression has been previously identified in spontaneously hypertensive rat lungs (27), this is the first report of NGF overexpression in PH. Differences in NGF expression observed in patients with PH-COPD versus with IPAH may be explained by the different pathophysiologic mechanisms involved in these two forms of PH. In particular, CH induces specific cellular and molecular mechanisms, which

trigger inflammation and pulmonary vascular remodeling (28). In addition, there is increasing evidence to support a role of reactive oxygen species in CH PH (28–30).

Hypoxia and oxidative stress have been shown to increase NGF expression in various tissues (31, 32) so they may therefore contribute to NGF overexpression observed in PH-COPD. Inflammation may also play an important role in this process. Inflammatory cells, such as lymphocytes, macrophages, or mast cells, have been shown to produce NGF (18). These inflammatory cells infiltrated in and around pulmonary arteries could therefore be a source of NGF in PH. Moreover, NGF expression is up-regulated under inflammatory conditions in airway structural cells (18, 33, 34). Pulmonary vascular cells can secrete NGF (26), and may also contribute to NGF increased expression in inflammatory conditions (35–38). However, pulmonary inflammation differs according to the form of PH, and different inflammatory mechanisms may therefore also contribute to the differences in NGF expression observed in patients with PH-COPD versus patients with IPAH (28, 37). Finally, because the different IPAH samples used in this study were obtained from patients with end-stage IPAH receiving drug therapy, we cannot exclude that NGF overexpression may vary between stages of the disease and may also be influenced by treatments.

Our results also show increased expression and/or activity of both NGF receptors (TrkA and p75^{NTR}) in human and experimental PH. The TrkA receptor belongs to the family of receptor tyrosine-kinases (RTKs), sharing with them a similar mode of activation (39). Involvement of other RTKs, including platelet-derived growth factor receptor, fibroblast growth factor receptor, or c-kit, has already been described in pulmonary vascular remodeling (8, 10, 11, 40–42). In our study, TrkA protein expression was not different in patients with PH compared with control patients. However, TrkA phosphorylation on tyrosine residues was significantly increased in patients with PH-COPD and patients with IPAH, suggesting increased TrkA activity. Such increase was also observed in the two PH rat models used in this study. NGF expression, when elevated in PH-COPD pulmonary arteries, may contribute to TrkA increased activation. In addition, hypoxia can down-regulate

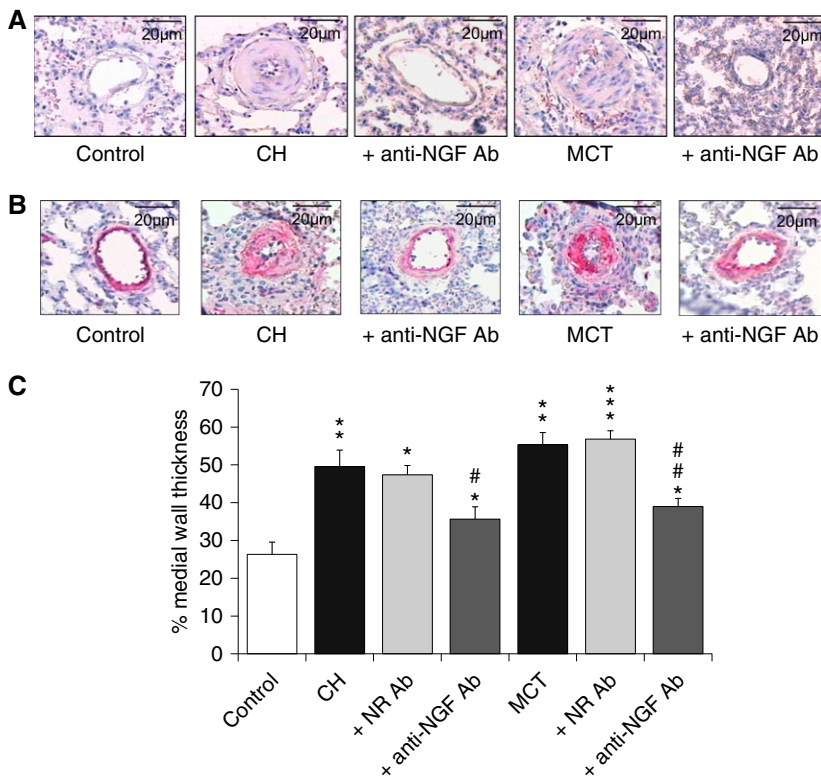


Figure 8. Reversal of increased medial wall thickness by anti-nerve growth factor (NGF) blocking antibodies in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. (A and B) Representative sections of small pulmonary arteries from the different experimental groups stained with hematoxylin and eosin (A) or immunostained for α -smooth muscle actin (B). (C) Percentage of medial wall thickness of small pulmonary arteries (external diameter $< 50 \mu\text{m}$) in control rats, after chronic hypoxia (CH) or monocrotaline treatment (MCT), and in rats exposed to CH or MCT and curatively treated with nonrelevant (+ NR Ab) or anti-NGF blocking (+ anti-NGF Ab) antibodies. Data represent means \pm SEM. $n = 8\text{--}12$ rats per group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$ versus control animals; $\#P < 0.05$ and $##P < 0.01$ versus CH or MCT.

expression of numerous protein tyrosine phosphatases, therefore leading to RTKs enhanced activity (43). Because PH-COPD is usually associated with hypoxemia, such mechanism may also occur for the TrkA receptor and needs to be further investigated.

Alternative mechanisms increasing TrkA phosphorylation have been described even in the absence of increased NGF expression. In particular, changes in the composition of plasma membrane lipids can potentiate NGF-mediated TrkA activation, or even activate the TrkA receptor in the absence of NGF (44). Altered membrane lipid domains have been described in PH (45) and may thus contribute to TrkA-enhanced activity in IPAH lungs. Our results also show increased expression of the $p75^{\text{NTR}}$ receptor in human and experimental PH. This receptor belongs to the death receptors family (39), but may

paradoxically contribute to pulmonary vascular remodeling, as recently shown for the TNF-related apoptosis-inducing ligand (46). Taken together, our findings highlight the fact that NGF and/or its signaling pathways are deregulated in experimental and human PH. This may therefore contribute to the progression of the disease in patients with PH-COPD and patients with IPAH, but probably through different mechanisms that remain to be determined. These results also suggest that targeting either NGF or its receptors may offer different therapeutic benefits in patients with PH-COPD and patients with IPAH.

Because expression of NGF and/or expression/activation of its receptors are increased in PH, we further investigated the potential role of NGF in this disease using two animal models of PH. Our results show that anti-NGF blocking antibodies prevent and reverse PH, as reflected by decreased

values of mPAP and right ventricular hypertrophy. These results suggest that NGF plays critical roles in PH development and persistence. Thus, we further investigated the role of NGF in three key pathophysiologic features of PH: (1) pulmonary arterial altered reactivity, (2) remodeling, and (3) inflammation.

First, we observed that NGF induced hyperreactivity of rat and human pulmonary arteries to contractile agents *ex vivo*. Consistently, we demonstrated in both *ex vivo* and *in vivo* studies that anti-NGF blocking antibodies totally prevented (preventive protocol) and partially reversed (curative protocol) pulmonary arterial hyperreactivity in CH-exposed or MCT-challenged rats. Other studies have already shown that NGF induces airway hyperreactivity in both animal and human tissues (18, 47), but this is the first report of NGF-induced vascular hyperreactivity, whatever the tissue considered. Such modulation of pulmonary reactivity by NGF is in accordance with a previous study showing that the $p75^{\text{NTR}}$ receptor may be an important regulator of pulmonary vascular tone (48). In addition, other neurotrophins, such as brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3, have also been shown to regulate pulmonary vascular reactivity, by inducing pulmonary endothelial nitric oxide production and relaxation (49). By contrast, in our experiments, NGF by itself did not produce any effect on pulmonary arteries. In addition, the relaxation of rat pulmonary arteries induced by nitric oxide-dependent or -independent agents was not modified in the presence of NGF. These results therefore suggest that in pulmonary arteries, effects and underlying signaling pathways differ depending on the neurotrophin considered.

In other tissues, NGF has been found to induce a rapid relocalization of calcium channels at the cell membrane (50) and can inhibit potassium channels (51). NGF is also known to augment neuronal responsiveness to noradrenaline by increasing expression of the α -adrenergic receptor (52), and can activate the RhoA/ROCK pathway through activation of the $p75^{\text{NTR}}$ receptor (53). Such NGF-dependent mechanisms, if occurring in pulmonary arteries, may contribute to the altered pulmonary arterial reactivity in PH.

We previously demonstrated that NGF induced proliferation and migration of

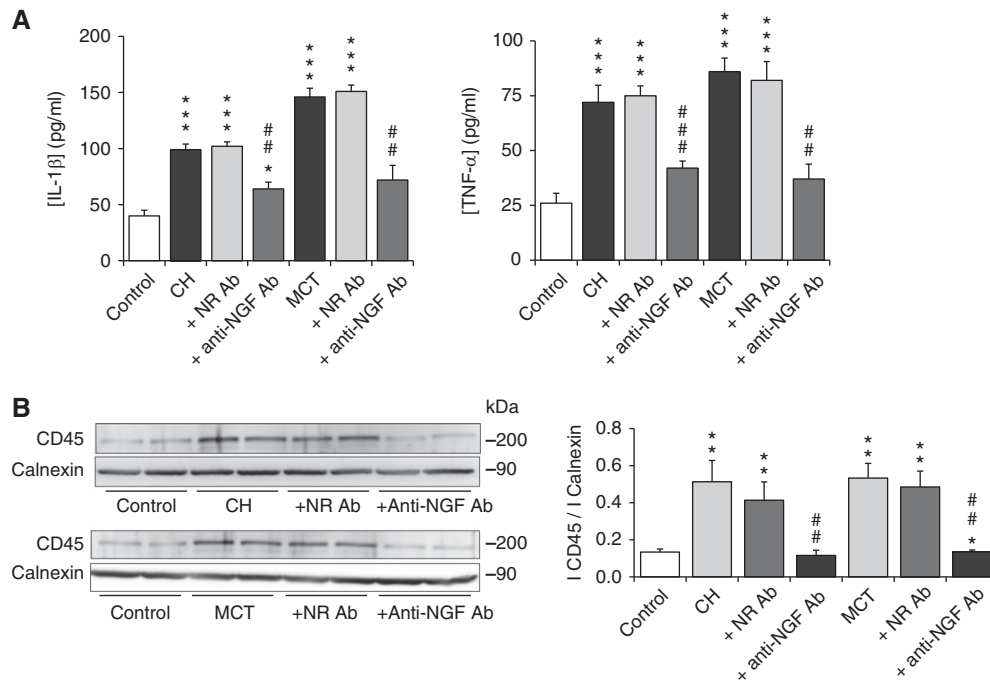


Figure 9. Reversal of inflammation by anti-nerve growth factor (NGF) blocking antibodies in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. (A) Secretions of the proinflammatory cytokines IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by pulmonary arteries in control rats, after chronic hypoxia (CH) or monocrotaline treatment (MCT), and in rats exposed to CH or MCT and curatively treated with nonrelevant (+ NR Ab) or anti-NGF blocking (+ anti-NGF Ab) antibodies. Cytokines were determined by ELISA (results expressed as pg cytokine/ml supernatant after 24 h of incubation in the culture medium). Data represent means \pm SEM. $n = 8$ –12 rats per group. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus control animals; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus CH or MCT. (B) CD45 quantification assessed by Western blot analysis in whole-lung homogenates from the same experimental groups. Immunoblots are representative of $n = 6$ rats per group, showing identical results. CD45 expression is normalized to calnexin. Quantification of CD45 expression is shown in the *bar graphs*, with data representing means \pm SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control animals; ## $P < 0.01$ versus CH or MCT.

hPASMCs and hPAECs *in vitro* (26). These results are in accordance with the ability of NGF to induce proliferation and/or migration of endothelial or smooth muscle cells from various tissues (15, 16, 54, 55). They are also in accordance with a recent study showing that brain-derived neurotrophic factor augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary arteries (56). Interestingly, NGF-induced maximal proliferation occurred at low NGF concentrations in hPASMCs, and our results support a role of the TrkA receptor in this effect via activation of PI3K and ERK pathways. The maximal proliferative effect observed at 0.1 ng/ml of NGF is in accordance with NGF picomolar affinity for the TrkA receptor, and ERK pathway has also been shown to be implicated in TrkA-induced proliferation of human airway smooth muscle cells (15). Surprisingly, NGF-induced hPAEC proliferation requires both TrkA and p75^{NTR} receptors, activating atypical PKCs and the transcription factor NF- κ B. The maximal proliferative effect in hPAECs

observed at 100 ng/ml of NGF is in accordance with a role of the p75^{NTR} receptor, because NGF has a lower affinity for this receptor. Altogether, these results therefore support a role of NGF in pulmonary vascular remodeling associated with PH, through activation of both TrkA and p75^{NTR} receptors that lead to distinct intracellular signaling pathways in hPASMCs and hPAECs.

Consistently, NGF inhibition *in vivo* prevented (preventive protocol) and reversed (curative protocol) increased thickness of the pulmonary arterial media, in particular smooth muscle accumulation. Because proliferation and migration of PASMCs and PAECs are major features contributing to pulmonary vascular remodeling through medial and intimal hypertrophy (7), these results strongly suggest that NGF participates in pulmonary arterial remodeling, in particular smooth muscle remodeling *in vivo*.

Finally, we also showed that exogenous NGF triggers the secretion of IL-1 β and TNF- α by rat and human pulmonary

arteries *ex vivo*, as well as by hPASMCs and hPAECs *in vitro*. Furthermore, we demonstrated that activation of NGF receptors and their intracellular signaling pathways depends on the type of cell and on the cytokine of interest. In hPASMCs, NGF-induced cytokine secretion involves the TrkA receptor, with activation of PI3K and ERK pathways for IL-1 β and with activation of conventional PKCs, p38, and NF- κ B pathways for TNF- α secretion. In hPAECs, NGF-induced cytokine secretion involves the p75^{NTR} receptor, with activation of conventional PKCs, p38, and NF- κ B pathways. As for cell proliferation, the maximal cytokine secretion in hPASMCs is observed at 0.1 ng/ml of NGF, in accordance with NGF picomolar affinity for the TrkA receptor. In contrast, the maximal cytokine secretion in hPAECs is observed at 100 ng/ml of NGF, in accordance with a role of the NGF low-affinity p75^{NTR} receptor in this effect. Altogether, these results therefore show that NGF, activating both TrkA and p75^{NTR} receptors, but through distinct

signaling pathways, may contribute to pulmonary vascular inflammation associated with PH.

Consistently, anti-NGF blocking antibodies have been found to inhibit IL-1 β and TNF- α increased secretions by pulmonary arteries and to decrease the infiltration of inflammatory cells in lung tissues from CH-exposed or MCT-treated rats, both in preventive and in curative protocols. Levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , are known to be increased in human and experimental PH, not only in the systemic circulation, but also locally in pulmonary arteries (38, 57, 58). A proinflammatory role of NGF has already been shown in airway inflammatory diseases, such as asthma (18). NGF can stimulate various

inflammatory cells to trigger their recruitment to inflamed tissues, activation, and survival (59–62). In accordance with these studies, our *in vivo* results argue in favor of a role of NGF in PH-associated inflammation, by stimulating the production of IL-1 β and TNF- α by pulmonary vascular cells and by recruiting inflammatory cells in lung tissues.

In conclusion, we demonstrate in this study that targeting NGF may be an interesting novel therapeutic strategy in PH treatment. Indeed, our *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* findings consistently indicate that NGF inhibition not only decreases pulmonary vascular remodeling, but also decreases pulmonary arterial hyperreactivity and inflammation, which

are all important features of PH. The recent development of several humanized anti-NGF blocking antibodies (i.e., tanezumab and fasinumab) to treat pain associated with osteoarthritis (63, 64), acute sciatic (65), or chronic low back pain (66) may therefore rapidly open new perspectives in the treatment of PH. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

Acknowledgment: The authors thank Mrs. M. Lacayerie and Mrs. M. Lepiez for excellent animal care, Dr. C. Toussaint for his technical assistance with mean pulmonary arterial pressure measurements, Dr. F. Delom for his kind gift of the anticalnexin antibody, and Mrs. C. Freund-Chapellier for her constructive remarks on the manuscript.

References

- Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, *et al.*; Task Force for Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of European Society of Cardiology (ESC); European Respiratory Society (ERS); International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009;34:1219–1263.
- Montani D, Günther S, Dorfmueller P, Perros F, Girend B, Garcia G, Jais X, Savale L, Artaud-Macari E, Price LC, *et al.* Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:97.
- Sitbon O, Morrell N. Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *Eur Respir Rev* 2012;21:321–327.
- Guignabert C, Tu L, Le Hirss M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, Huertas A, Humbert M, Montani D. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *Eur Respir Rev* 2013;22:543–551.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(Suppl. 12):13S–24S.
- Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ, Nicolls MR. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J* 2012;40:1555–1565.
- Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, *et al.* Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(Suppl 1):S10–S19.
- Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:81–88.
- Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811–2821.
- Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadique P, Dartevelle P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, *et al.* Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest* 2009;119:512–523.
- Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevelle P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:311–322.
- Cowan WM. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:551–600.
- Manni L, Rocco ML, Bianchi P, Soligo M, Guaragna M, Barbaro SP, Aloe L. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors* 2013;31:115–122.
- Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, Terzano C, Cardillo G, Amenta F, Bronzetti E. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:12–19.
- Freund-Michel V, Bertrand C, Frossard N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal* 2006;18:621–627.
- Dagnell C, Kemi C, Klominek J, Eriksson P, Sköld CM, Eklund A, Grunewald J, Olgart Höglund C. Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Transl Res* 2007;150:303–310.
- Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6162–6167.
- Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* 2008;117:52–76.
- Freund-Michel V, Coste F, Dubois M, Courtois A, Marthan R, Savineau J, Muller B. NGF contributes to medial and intimal remodelling of pulmonary arteries in pulmonary hypertension: receptors and signalling pathways involved in smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Arch Cardiovasc Dis* 2014;6(Suppl 1):76.
- Freund-Michel V, Dubois M, Dahan D, Courtois A, Marthan R, Savineau J, Muller M. Expression and role of the nerve growth factor NGF in pulmonary hypertension. Presented at the European Respiratory Society Annual Congress. September 24–28, 2011, Amsterdam, the Netherlands.
- Freund-Michel V, Salagierska M, Dubois M, Courtois A, Laroumanie F, Autissier M, Guibert C, Savineau J, Marthan R, Muller B. Nerve growth factor expression and function in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2010;36(Suppl 54):P1080.
- Freund-Michel V, Salagierska M, Dubois M, Guibert C, Courtois A, Marthan R, Muller B. Potential role of the nerve growth factor NGF in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009;34(Suppl 53):A4330.
- Freund-Michel V, Toussaint C, Dubois M, Courtois A, Savineau J, Marthan R, Muller B. Preventive and curative effects of anti-NGF blocking antibodies in experimental pulmonary hypertension. *Arch Cardiovasc Dis* 2012;3(Suppl 1):83.

24. Billaud M, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications. *PLoS One* 2009;4:e6432.
25. Sherer TB, Neff PS, Hankins GR, Tuttle JB. Mechanisms of increased NGF production in vascular smooth muscle of the spontaneously hypertensive rat. *Exp Cell Res* 1998;241:186–193.
26. Freund-Michel V, Muller B, Frossard N. Expression and role of the TrkA receptor in pulmonary inflammatory diseases. In: Nagal A, editor. *Inflammatory diseases: a modern perspective*. Rijeka, Croatia: InTech; 2011.
27. Ricci A, Bronzetti E, Mannino F, Felici L, Terzano C, Mariotta S. Elevated neurotrophin and neurotrophin receptor expression in spontaneously hypertensive rat lungs. *Growth Factors* 2004;22:195–205.
28. Pugliese SC, Poth JM, Fini MA, Olschewski A, El Kasmi KC, Stenmark KR. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308:L229–L252.
29. Fresquet F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R, Muller B. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol* 2006;148:714–723.
30. Freund-Michel V, Guibert C, Dubois M, Courtois A, Marthan R, Savineau JP, Muller B. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Ther Adv Respir Dis* 2013;7:175–200.
31. Ishitsuka K, Ago T, Arimura K, Nakamura K, Tokami H, Makihara N, Kuroda J, Kamouchi M, Kitazono T. Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection. *Microvasc Res* 2012;83:352–359.
32. Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Estévez AG, Beckman JS, Barbeito L. Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite. *In Vivo* 2004;18:269–274.
33. Freund V, Pons F, Joly V, Mathieu E, Martinet N, Frossard N. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 2002;20:458–463.
34. Pons F, Freund V, Kuissu H, Mathieu E, Olgart C, Frossard N. Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol* 2001;428:365–369.
35. Cracowski JL, Chabot F, Labarère J, Faure P, Degano B, Schwebel C, Chaouat A, Reynaud-Gaubert M, Cracowski C, Sitbon O, et al. Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2014;43:915–917.
36. Huertas A, Perros F, Tu L, Cohen-Kaminsky S, Montani D, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M. Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay. *Circulation* 2014;129:1332–1340.
37. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014;115:165–175.
38. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;122:920–927.
39. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:167–173.
40. Montani D, Perros F, Gambaryan N, Girerd B, Dorfmueller P, Price LC, Huertas A, Hammad H, Lambrecht B, Simonneau G, et al. C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:116–123.
41. Schermuly RT, Ghojrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:443–455.
42. Tu L, De Man FS, Girerd B, Huertas A, Chaumais MC, Lecerf F, François C, Perros F, Dorfmueller P, Fadel E, et al. A critical role for p130Cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:666–676.
43. ten Freyhaus H, Dagnell M, Leuchs M, Vantler M, Berghausen EM, Caglayan E, Weissmann N, Dahal BK, Schermuly RT, Ostman A, et al. Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1092–1102.
44. MacPhee I, Barker PA. Extended ceramide exposure activates the trkA receptor by increasing receptor homodimer formation. *J Neurochem* 1999;72:1423–1430.
45. Li XA, Everson WV, Smart EJ. Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:92–96.
46. Hameed AG, Arnold ND, Chamberlain J, Pickworth JA, Paiva C, Dawson S, Cross S, Long L, Zhao L, Morrell NW, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) reverses experimental pulmonary hypertension. *J Exp Med* 2012;209:1919–1935.
47. Frossard N, Naline E, Olgart Höglund C, Georges O, Advenier C. Nerve growth factor is released by IL-1beta and induces hyperresponsiveness of the human isolated bronchus. *Eur Respir J* 2005;26:15–20.
48. Xu M, Remillard CV, Sachs BD, Makino A, Platoshyn O, Yao W, Dillmann WH, Akassoglou K, Yuan JX. p75 neurotrophin receptor regulates agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1529–H1538.
49. Meuchel LW, Thompson MA, Cassivi SD, Pabelick CM, Prakash YS. Neurotrophins induce nitric oxide generation in human pulmonary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2011;91:668–676.
50. Jia M, Li M, Liu XW, Jiang H, Nelson PG, Guroff G. Voltage-sensitive calcium currents are acutely increased by nerve growth factor in PC12 cells. *J Neurophysiol* 1999;82:2847–2852.
51. Luther JA, Birren SJ. p75 and TrkA signaling regulates sympathetic neuronal firing patterns via differential modulation of voltage-gated currents. *J Neurosci* 2009;29:5411–5424.
52. Zhang Q, Tan Y. Nerve growth factor augments neuronal responsiveness to noradrenaline in cultured dorsal root ganglion neurons of rats. *Neuroscience* 2011;193:72–79.
53. Deponti D, Buono R, Catanzaro G, De Palma C, Longhi R, Meneveri R, Bresolin N, Bassi MT, Cossu G, Clementi E, et al. The low-affinity receptor for neurotrophins p75NTR plays a key role for satellite cell function in muscle repair acting via RhoA. *Mol Biol Cell* 2009;20:3620–3627.
54. Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappalà G, Pafumi C, Bernardini R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* 2002;16:1307–1309.
55. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol* 1995;147:309–324.
56. Kwapiszewska G, Chwalek K, Marsh LM, Wygrecka M, Wilhelm J, Best J, Egemnazarov B, Weisel FC, Osswald SL, Schermuly RT, et al. BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 2012;181:2018–2029.
57. Gillespie MN, Goldblum SE, Cohen DA, McClain CJ. Interleukin 1 bioactivity in the lungs of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;187:26–32.
58. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1628–1631.
59. Barouch R, Kazimirsky G, Appel E, Brodie C. Nerve growth factor regulates TNF-alpha production in mouse macrophages via MAP kinase activation. *J Leukoc Biol* 2001;69:1019–1026.
60. Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 1998;28:3240–3251.

61. Päch G, Braun A, Meents N, Kerzel S, Quarcoo D, Raap U, Hoyle GW, Nockher WA, Renz H. Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:818–826.
62. Sin AZ, Roche EM, Togias A, Lichtenstein LM, Schroeder JT. Nerve growth factor or IL-3 induces more IL-13 production from basophils of allergic subjects than from basophils of nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:387–393.
63. Brown MT, Murphy FT, Radin DM, Davignon I, Smith MD, West CR. Tanezumab reduces osteoarthritic hip pain: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *Arthritis Rheum* 2013;65:1795–1803.
64. Tiseo PJ, Kivitz AJ, Ervin JE, Ren H, Mellis SJ. Fasinumab (REGN475), an antibody against nerve growth factor for the treatment of pain: results from a double-blind, placebo-controlled exploratory study in osteoarthritis of the knee. *Pain* 2014;155:1245–1252.
65. Tiseo PJ, Ren H, Mellis S. Fasinumab (REGN475), an antinerve growth factor monoclonal antibody, for the treatment of acute sciatic pain: results of a proof-of-concept study. *J Pain Res* 2014;7:523–530.
66. Gimbel JS, Kivitz AJ, Bramson C, Nemeth MA, Keller DS, Brown MT, West CR, Verburg KM. Long-term safety and effectiveness of tanezumab as treatment for chronic low back pain. *Pain* 2014;155:1793–1801.

Publication n°5

« Involvement of NGF and its receptors

in experimental severe experimental pulmonary arterial hypertension »

Florence Coste, Christelle Guibert, Mathilde Dubois, Arnaud Courtois,
Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau, Bernard Muller et Véronique Freund-Michel

En cours de rédaction

Il existe des formes sévères de l'HTAP (HTAPs) qui présentent des valeurs de pressions artérielles pulmonaires (PAPm) très élevées, un remodelage cardiaque avancé et des lésions anatomopathologiques spécifiques. Ayant précédemment montré une surexpression et un rôle du facteur de croissance des nerfs (NGF) dans l'HTAP, nous avons voulu étudier ici si le NGF était également impliqué dans la physiopathologie de l'HTAPs, en s'intéressant plus particulièrement au rôle de ses récepteurs, les récepteurs TrkA et p75^{NTR}.

En utilisant un modèle d'HTAPs chez le rat combinant une injection de monocrotaline avec un placement de quatre semaines en hypoxie chronique de quatre semaines, nous avons étudié les éventuelles modifications d'expression du NGF et si l'administration d'anticorps bloquants anti-NGF avait des effets préventifs et/ou curatifs. Nous avons également évalué dans ce modèle l'effet du blocage de chacun des récepteurs du NGF, en utilisant un inhibiteur de tyrosine-kinase du récepteur TrkA ou des anticorps bloquants anti-récepteur p75^{NTR}.

Nos résultats ont montré que l'expression du NGF était augmentée chez les rats HTAPs en comparaison aux rats contrôles. Les anticorps bloquants anti-NGF ont permis de prévenir l'élévation de la PAPm et l'hypertrophie du ventricule droit. De plus, l'utilisation de manière curative des anticorps bloquants anti-NGF a permis d'inhiber, au moins partiellement, l'augmentation de la PAPm, le remodelage du ventricule droit, l'inflammation, et le remodelage des artères pulmonaires. L'inhibition des récepteurs TrkA ou p75^{NTR} a également entraîné des effets curatifs dans ce modèle de rat HTAPs avec une inhibition au moins partielle des différents paramètres étudiés.

Ainsi, nos résultats montrent un rôle du NGF dans la physiopathologie de l'HTAPs expérimentale, qui implique à la fois les récepteurs TrkA et p75^{NTR}. Ces résultats suggèrent que le NGF pourrait donc être une cible thérapeutique d'intérêt dans l'HTAPs humaine.

Involvement of Nerve growth factor and its receptors in severe experimental pulmonary arterial hypertension

Florence Coste^{1, 2, 3}, Christelle Guibert^{1, 2}, Mathilde Dubois^{1, 2}, Arnaud Courtois^{1, 2},
Roger Marthan^{1, 2, 3}, Jean-Pierre Savineau^{1, 2}, Bernard Muller^{1, 2}, Véronique Freund-Michel^{1, 2}

¹ *INSERM, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France.* ² *Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000, Bordeaux, France.* ³ *CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France*

Corresponding author

Florence COSTE

Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, Université
Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Tel: +33 5 57 57 16 94

Fax: +33 5 57 57 16 95

E-mail: florence-coste@hotmail.fr

Co-authors email :

florence-coste@hotmail.fr; christelle.guibert@u-bordeaux.fr; mathilde.dubois@u-bordeaux.fr;
arnaud.courtois@u-bordeaux.fr; roger.marthan@u-bordeaux.fr; jean-pierre.savineau@u-bordeaux.fr;
bernard.muller@u-bordeaux.fr; veronique.michel@u-bordeaux.fr

Running head: Role of NGF in severe PAH

Keywords: severe pulmonary arterial hypertension; NGF; TrkA; p75^{NTR}; inflammation; remodeling

Total word count: 3752

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a life-threatening disease without any curative treatment. Severe PAH (sPAH) is a serious form of the disease with higher levels of pulmonary arterial pressure (PAP), intense cardiac remodeling, and specific pathologic pulmonary vascular lesions. Since nerve growth factor (NGF) is overexpressed and plays a role in PAH pathophysiology, we have here studied whether NGF may be involved in sPAH, with a particular interest in the potential role of NGF receptors (TrkA and p75^{NTR}).

In a rat model of sPAH, combining a single injection of monocrotaline and 4 weeks of chronic hypoxia, we studied whether NGF expression was modified and whether administration of anti-NGF blocking antibodies displayed preventive and/or curative effects. We also evaluated in this model the effects of NGF receptors blockade by use of a TrkA tyrosine kinase inhibitor or of anti-p75^{NTR} blocking antibodies.

NGF expression was increased in sPAH rats compared to control animals. Anti-NGF blocking antibodies displayed preventive effects on PAP elevation and right heart hypertrophy. In addition, curative treatment with anti-NGF blocking antibodies reversed, at least partially, increased PAP, right heart hypertrophy, pulmonary arterial inflammation and remodeling. Inhibition of either TrkA or p75^{NTR} receptors also displayed curative effects in sPAH rats with at least a partial reversion of these parameters.

Our results show a role of NGF in the pathophysiology of experimental sPAH, through activation of both TrkA and p75^{NTR} receptors, thus suggesting that NGF may be a new interesting therapeutic target in human sPAH.

Abstract word count: 244

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a life-threatening disease without any curative treatment, defined as an increase of mean pulmonary arterial pressure (mPAP) at or above 25 mmHg at rest (1). Severe PAH (sPAH) is a serious form of the disease with higher levels of mPAP, intense cardiac remodeling and with clinical severity (New York Heart Association class functional class III or IV) (2). Acute pulmonary vascular inflammation is also observed, with increased secretion of pro-inflammatory cytokines and recruitment of inflammatory cells into the pulmonary arterial wall (3, 4). In addition, intense pulmonary arterial remodeling occurs in proximal arteries with medial and adventitial thickening, and in microarteries with luminal occlusion and formation of a media *de novo* (4). In particular, specific pulmonary vascular lesions are observed, such as plexiform or thrombotic lesions (5).

A new therapeutic strategy in sPAH consists in combination therapy targeting distinct PAH-associated signalling pathways: the prostacyclin, endothelin and nitric oxide pathways. For instance, a therapeutic combination of ambrisentan and tadalafil lead to a decrease levels of N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels, considered as a sPH marker, associated to a higher percentage of patients with a satisfactory clinical response and a greater improvement in the 6-minute walk distance compare to a monotherapy (6). Although combination of PAH-targeted medications may offer clinical benefits, especially in PAH patients with severe hemodynamic impairment, drug interactions and more frequent adverse events were reported (1, 6, 7). In addition, since some patients experienced a progression of the disease despite receiving such combination therapy, identification of new therapeutic targets in this disease is therefore still essential for the development of new therapeutic strategies (8, 9).

In the search for such new therapeutic strategies, cellular and molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling have been extensively studied (4). Growth factors are known to play a role in excessive proliferation and migration of pulmonary arterial cells (10),

and may therefore represent new promising therapeutic targets. Among them, we have focused on the nerve growth factor (NGF), whose expression is increased in PAH and which plays a role in the pathophysiology of the disease (11). NGF can activate two receptors: the TrkA (tropomyosin-related kinase A) receptor, activated by NGF at picomolar concentrations, and the p75^{NTR} (p75 neurotrophin) receptor, activated by NGF at nanomolar concentrations (12). Both NGF receptors may be involved in PAH pathophysiology. Indeed, the TrkA receptor belongs to the tyrosine kinase receptor family, with other members of this family being already known to participate in pulmonary vascular remodeling, *i.e.* platelet-derived growth factor receptor, fibroblast growth factor receptor, or c-kit (13-16). The p75^{NTR} receptor is a member of the death receptor family, but may paradoxically contribute to pulmonary arterial remodelling, as shown for other members of this family, *i.e.* the TNF-related apoptosis-inducing ligand (17). In addition, the hypothesis of a role of both TrkA and p75^{NTR} receptors in PAH pathophysiology is reinforced by *in vitro* experiments showing both receptors being involved in pulmonary vascular inflammation and cell proliferation (11).

The aim of this study was therefore to evaluate whether NGF may be a potential therapeutic target in sPAH, with a particular interest in the potential role of both NGF receptors (TrkA and p75^{NTR}). To do so, we used a rat model of sPAH developed in our lab that combines monocrotaline (MCT) treatment and exposure to chronic hypoxia (Hx). This model mimics several aspects of sPAH, *i.e.* specific pulmonary vascular human-like lesions such as plexiform and thrombotic lesions (18). In this model, we tested whether *in vivo* inhibition of NGF displayed preventive or curative effects on increased mean PAP (mPAP), cardiac remodeling, increased cytokines secretions from pulmonary arteries, or pulmonary arterial remodeling. In the same model, we also evaluated the effects on these parameters of TrkA or p75^{NTR} receptors *in vivo* inhibition, using TrkA tyrosine-kinase inhibitor K252a or anti- p75^{NTR} blocking antibodies, respectively.

Methods

- **Animal experiments**

All animal studies were made according to European and French directives about vertebrate animals protection use for animal experiments. Agreement was obtained from French authorities (number A33-063-907) and all the protocols used were approved by the local ethics committee (Comité d'éthique regional d'Aquitaine, protocol number: 50110016-A).

Male Wistar rats (250-350 g) were randomly assigned into different groups: controls (CTRL), sPAH (MCT+Hx), sPAH treated with anti-NGF blocking antibodies (rabbit polyclonal IgG anti-human NGF, 10 µg/kg, Millipore; MCT+Hx+Ab NGF), sPAH treated with K252a (TrkA tyrosine kinase inhibitor, 80 µg/Kg, Sigma; MCT+Hx+K252a), or sPAH treated with anti-p75^{NTR} blocking antibodies (rabbit polyclonal IgG against human p75^{NTR}, 10 µg/kg, Millipore; MCT+Hx+Ab p75).

Severe PAH was induced by combining a single monocrotaline injection (MCT, 60 mg/kg, Sigma) at Day 1 with exposure to chronic hypoxia (Hx, 380 mmHg) from Day 2 to Day 28, as previously described (18). Control rats were injected with MCT vehicle and maintained in a normobaric/normoxic environment (room air) for 28 days. Hypobaric chambers were opened three times a week for animal care and cleaning, and all animals had free access to food and water.

- **Injection protocols**

As previously described (11), sPAH rats were treated with anti-NGF blocking antibodies either at days 0-2-9-16-23 according to a preventive protocol (MCT+Hx+Ab NGF prev), or at days 15-19-22-26 according to a curative protocol (MCT+Hx+Ab NGF cur). The same

curative protocol was used for injections of anti-p75^{NTR} blocking antibodies. Curative injections of K252a were made at days 15-18- 20-25-27, according to the literature (19).

Groups of control animals, treated with MCT vehicle and exposed to normoxic conditions, were also treated with anti-NGF blocking antibodies, K252a or with anti-p75^{NTR} blocking antibodies, following the same protocols but without exposing animals to MCT+Hx. Results showed that these treatments did not significantly modify the parameters studied in control conditions when administered alone. In addition, groups of sPAH rats were also treated with non-relevant antibodies (rabbit polyclonal IgG, 10 µg/kg, Millipore) or with K252a vehicle (0.5-1% dimethyl sulfoxide, DMSO). Results showed that neither non-relevant antibodies nor DMSO had any effect on the parameters studied in sPAH rats.

- **Measurement of pulmonary arterial pressure**

On Day 28, mPAP was measured in close-chest rats, after anesthesia with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg, CEVA santé animale). A polyethylene catheter (2.5-Fr, PE-5, Biotrol), slightly angled at the tip, was inserted with the angle directed anteriorly into the left external jugular vein and through the right ventricle. A clockwise rotation of 90° then placed the catheter into the main pulmonary artery where mPAP was measured by use of a fluid-filled force transducer connected to a data acquisition device (Powerlab, AD Instruments), as previously described (11).

- **Assessment of right ventricular hypertrophy**

After mPAP measurement, rats were euthanized by sodium pentobarbital overdose (200 mg/kg ip). A thoracotomy was performed, and after exsanguination, the lungs and heart were rapidly removed and rinsed in Krebs solution containing 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄ and 5 mM glucose. The

heart was dissected by removing atria, main pulmonary artery and aorta, and by separating the right ventricular wall (RV) from the left ventricular wall (LV) and septum (S). Wet weight of RV and [LV + S] was determined. Right ventricular hypertrophy was expressed as the Fulton Index ($RV / [LV + S]$) (11).

- **Preparation of pulmonary artery samples**

Lungs were dissected in Krebs solution (pH 7.4) at 25°C. After removal of the connective tissues, intrapulmonary arteries were dissected under binocular control, and either used as fresh tissue for contraction studies, or incubated in culture medium for 24h to assess secretion of NGF or of pro-inflammatory cytokines.

- **Dosage of NGF and of pro-inflammatory cytokines**

Intrapulmonary arteries were incubated in culture medium for 24h (DMEM supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% sodium pyruvate and 1% nonessential amino acids, 37°C, 5% CO₂, 200 µl for 10 mg tissue). Supernatants were then collected, snap frozen and stored at -20°C until analysis. Determination of NGF, interleukin-1β (IL-1β) or tumor necrosis factor-α (TNF-α) was assessed by use of ELISA kits (NGF E_{max}, Promega; rat IL-1β or TNF-α Quantikine ELISA kit, R&D Systems). NGF, IL-1β and TNF-α levels were normalized to total tissue protein content, the latter determined by the Lowry method (Bio-Rad).

- **Lung tissue sample preparation**

One lobe of right lungs was flushed to get rid of the blood and fixed for histology in 4% neutral buffered formalin for 24h. After dehydration, lobes were subjected to paraffin embedding, and sectioning at 4µm was performed.

- **Evaluation of pulmonary arterial wall thickness and luminal occlusion**

Percentage of wall thickness was quantitatively evaluated by using hematoxylin and eosin staining (VWR), performed after deparaffinization of tissue sections according to common histological procedure. In each rat, at least 10 intracinar microarteries with an external diameter less than 50 μ m or between 50 and 100 μ m were observed to evaluate arterial wall thickness. Luminal occlusion was semi-quantitatively evaluated with a score after van Gieson staining, according to the manufacturer's instructions (Bio-Optica). Cell nuclei and elastic fibers were colored in black, contrasting with other surrounding tissues colored in blue. For each rat, 10 intracinar microarteries with an external diameter less than 50 μ m were randomly selected and observed. The exact method is detailed elsewhere (18).

- **Statistical analysis**

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of n independent observations. A Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate whether data were normally distributed. If so, differences between groups were assessed with a one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test. For parameters that were not normally distributed, single comparisons were performed with a Mann-Whitney test, and multiple comparisons were performed with a one-way ANOVA followed by a Dunn test. All data were analyzed using Graphpad PRISM software (v6, Graphpad Software), with $p < 0.05$ considered significant.

Results

NGF increased secretion by pulmonary arteries in sPAH rats and effects of anti-NGF blocking antibodies, K252a or anti-p75^{NTR} blocking antibodies on increased mPAP and cardiac remodeling in these rats

Basal NGF secretion by pulmonary arteries was observed in control rats, and this secretion was significantly increased in sPAH rats (115% increase, $p < 0.01$) (Fig. 1A).

Compared to controls, mPAP was significantly increased in sPAH rats (99% increase, $p < 0.001$), and this increase was significantly reduced after treatment with anti-NGF blocking antibodies, administered either preventively (54% decrease, $p < 0.001$ vs sPAH rats, Fig. 1B) or curatively (69% decrease, $p < 0.001$ vs sPAH rats, Fig. 1C). Significant right heart hypertrophy was observed in sPAH rats compared to controls (148% increase, $p < 0.001$), and this hypertrophy was significantly reduced both in the preventive and curative protocols (85% decrease, $p < 0.01$ and 78% decrease, $p < 0.001$ vs sPAH rats respectively) (Fig. 1D, E).

The increase in mPAP observed in sPAH rats was also significantly reduced after a curative treatment with K252a (71% decrease, $p < 0.001$, Fig.2A) or anti-p75^{NTR} antibodies (71% decrease, $p < 0.001$, Fig.2B). In sPAH rats, significant reduction in right heart hypertrophy was also observed after the curative treatment with K252a (76% decrease, $p < 0.001$) (Fig. 2C), but no significant effect was observed on this parameter after treatment with anti-p75^{NTR} antibodies (Fig. 2D).

Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by pulmonary arteries is prevented or reversed by blocking NGF or its receptors

Secretion of IL-1 β by pulmonary arteries was significantly increased in sPAH rats compared to controls (452% increase, Fig. 3 A, B, C, D), and this increase was significantly reduced after treatment with anti-NGF blocking antibodies, either in the preventive (69% decrease, $p < 0.01$) or in the curative protocols (84% decrease, $p < 0.05$) (Fig. 3 A, B). Similar effects were observed on pulmonary arterial TNF- α secretion (Fig. suppl 1 A, B). In a curative protocol, regarding blockade of NGF receptors, IL-1 β increased secretion by pulmonary arteries in sPAH rats was significantly reduced after treatment with K252a (78% decrease, $p < 0.001$) (Fig. 3 C), but was not significantly modified after treatment with anti-p75^{NTR} blocking antibodies (Fig. 3 D).

Pulmonary arterial remodeling is prevented or reversed by inhibiting NGF or blocking its receptors

Compared to the CTRL group, pulmonary microarteries (diameter $< 50\mu\text{m}$) of sPAH rats displayed two classical pathophysiological aspects of the disease, *i.e.* increased pulmonary arterial wall thickness (40% increase, $p < 0.001$, Fig.4 A-B, G) and luminal occlusion (150% increase, $p < 0.001$, Fig.4 C-D, G). The increase in pulmonary arterial wall thickness observed in sPAH rats was partially prevented (preventive protocol, 83% decrease, $p < 0.001$) or reversed (curative protocol, 90% decrease, $p < 0.05$) after treatment with anti-NGF blocking antibodies (Fig. 4A). This parameter was also significantly decreased in sPAH rats curatively treated either with K252a (84% decrease, $p < 0.001$) or with anti-p75^{NTR} blocking antibodies (88% decrease, $p < 0.05$) (Fig. 4B). Similar results were observed in larger pulmonary arteries (Fig. suppl. 2).

In addition, luminal occlusion was also significantly reduced in sPAH rats after treatment with anti-NGF blocking antibodies administered either preventively or curatively

(51 or 43% decrease, respectively, $p < 0.001$ for both) (Fig. 4C). In sPAH rats, a curative treatment with either K252a or anti-p75^{NTR} blocking antibodies also induced a significant decrease in pulmonary arterial luminal occlusion (48% or 55% decrease, respectively, $p < 0.001$) (Fig. 4D).

Discussion

In this study, we show that NGF secretion by pulmonary arteries is significantly increased in a rat model of severe PAH. In addition, in this model, inhibition of NGF by use of anti-NGF blocking antibodies significantly prevented or reversed increased mPAP, cardiac remodeling, secretion of pro-inflammatory cytokines and pulmonary arterial remodeling, *i.e.* increased pulmonary arterial wall thickness and luminal occlusion. We also show that blockade of the TrkA receptor, but not of the p75^{NTR} receptor, partially reversed IL-1 β increased secretion by pulmonary arteries in sPAH rats. By contrast, blockade of both NGF receptors partially reversed pulmonary arterial remodeling in these rats. Altogether these results show, for the first time, a role of NGF in severe PAH pathophysiology, through activation of its TrkA and p75^{NTR} receptors.

In our experiments, NGF basal secretion was detected in control rat pulmonary arteries, as previously described (11) and in accordance with the literature in humans (20). Our results show that pulmonary arteries from sPAH rats secrete more NGF than those from control rats. This result is in accordance with previous data showing NGF increased secretion by pulmonary arteries in experimental or human PH (11). In our previous experiments, we reported lower NGF levels secreted by pulmonary arteries from either rats treated with MCT alone or exposed to Hx alone compared to the results observed with sPAH rats here in this study (around 300pg/ml in Hx or MCT rats *versus* more than 400pg/ml in sPAH rats) (11). These results therefore suggest that NGF levels secreted by pulmonary arteries may increase in parallel with PAH severity.

Interestingly, in this sPAH model, increase in mPAP was prevented by anti-NGF blocking antibodies, suggesting a role of NGF in the development of sPAH pathophysiology. Our previous results had already suggested such a role for NGF by showing a preventive effect of anti-NGF blocking antibodies on increased mPAP in experimental PH induced by MCT or Hx alone (11). As previously observed in these models, anti-NGF blocking antibodies administered in a curative protocol also partially reversed increased mPAP in sPAH rats in our experiments.

Such curative effect on mPAP increase was also observed when inhibiting either TrkA or p75^{NTR} receptors, thus suggesting involvement of both receptors activated by NGF in PH pathophysiology. These *in vivo* results are in accordance with our previous *in vitro* results, showing a role of both NGF receptors in pulmonary vascular inflammation and cell proliferation (11).

Tyrosine kinase receptors seem to be promising therapeutic targets in PH (21). A potential role of Trk receptors, in particular of the TrkB receptor, had been previously suggested in pulmonary vascular remodelling, through stimulation of pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation (22). In addition, a recent study showed beneficial effects of quercetin in a rat model of PH induced after 4 weeks of chronic hypoxia, through modulation of the TrkA receptor and its signalling pathways (23). Together with these data of the literature, our results therefore reinforce a role of the TrkA receptor in PH pathophysiology.

Our results also suggest a role of the p75^{NTR} receptor in increased mPAP in sPAH rats. Although this result may seem surprising, a paradoxical contribution of death receptors to cell survival and proliferation has already been described (11, 17) and is in accordance with our present results showing a partial inhibition of pulmonary arterial wall thickening and luminal

occlusion with anti- p75^{NTR} antibodies in sPAH rats. Such involvement of the p75^{NTR} receptor in pulmonary vascular remodeling may therefore contribute to increase mPAP in this model.

The health of the right ventricle is the main factor prognostic in PAH patients (24). However, although most patients with PAH die as a result of progressive right heart failure, current PAH treatments are not targeting the heart yet. This parameter is really difficult to treat in particular because of its fibrotic characteristics difficult to reverse (25). Very interestingly, in our study, anti-NGF blocking antibodies were able to decrease right heart hypertrophy. NGF increased expression in the right ventricle is associated with MCT-induced right ventricular hypertrophy (26). NGF is able to induce cardiomyocyte proliferation (27) and to inhibit their apoptosis (28). These two parameters are protective in heart failure, but are aggravating factors by promoting right heart hypertrophy in PAH pathophysiology (4). Both NGF receptors are expressed in the heart (29). Involvement of the TrkA receptor has already been well described in cardiomyocyte proliferation (30), apoptosis (28) and NGF is an endogenous pro-survival factor for cardiomyocytes through activation of the TrkA receptor (31). In line with these data, our results therefore suggest a predominant role of the TrkA receptor in NGF-induced cardiac remodeling in PH.

Modification of mPAP and cardiac remodeling are the consequences of structural and functional alterations of pulmonary arteries in PAH, including pulmonary arterial inflammation and intense remodeling (4, 32). Our previous results showed that anti-NGF blocking antibodies inhibited pulmonary arterial inflammation and remodeling *in vitro* and *in vivo* (11). Although the role of NGF receptors was investigated *in vitro*, their *in vivo* role remained unknown until yet. Therefore, in the present study, we further evaluated whether

NGF may also participate in pulmonary arterial inflammation and remodeling in sPAH rats through activation of TrkA and/or p75^{NTR} receptors.

Secretion of inflammatory cytokines such as IL-1 β by pulmonary arteries is increased in classical models of PH (monocrotaline and chronic hypoxia) (11) as well as in human PH at pulmonary and systemic levels (33, 34). Levels of such pro-inflammatory cytokines are correlated to mortality in PAH patients (35), and may therefore reflect the severity of the disease. NGF is already known as a mediator of inflammation in the lung, being able to induce cytokine release from inflammatory cells such as mast cells and basophils (12). Our previous results showed NGF ability to stimulate IL-1 β secretion from pulmonary arteries *ex vivo*, or from pulmonary vascular cells *in vitro* (11). *In vivo*, in classical PH models, preventive of curative treatment with anti-NGF blocking antibodies inhibited this increased cytokine secretion (11). In our present study, such increase in cytokines secretion by pulmonary arteries was also observed in sPAH rats, and this increase was partially reversed after treatment with anti-NGF blocking antibodies, thus confirming a role of NGF in pulmonary vascular inflammation.

Our previous *in vitro* studies have shown that NGF induces IL-1 β secretion by both pulmonary arterial endothelial and smooth muscle cells, but through activation of distinct receptors and signalling pathways. In endothelial cells, NGF-induced IL-1 β secretion is due to activation of the p75^{NTR} receptor and signalling pathways involving PKCs, p38 and NF- κ B, whereas in smooth muscle cells, NGF activates the TrkA receptor and downstream PI3K and ERK signalling pathways (11). In our present *in vivo* study, increased IL-1 β secretion by pulmonary arteries was partially inhibited after treatment with K252a, but not with anti-p75^{NTR} blocking antibodies, thus suggesting an exclusive role of the TrkA receptor in this

effect. In addition to pulmonary vascular structural cells, inflammatory cells can also be a source of pro-inflammatory cytokines in PH. IL-1 β is produced by circulating monocytes, tissue macrophages, lymphocytes B, fibroblasts, smooth muscle and endothelial cells, and all these cells are expressing both NGF receptors (36), but they may not both contribute to the same effects in these cells (37). Regarding our results, we might therefore hypothesize that the TrkA receptor is mainly involved in NGF-induced cytokine production *in vivo* and this hypothesis therefore deserves further study in the future.

Since there is no PAH curative treatment, current studies have been focusing on a better comprehension of the cellular and molecular mechanisms involved in pulmonary arterial remodeling, in order to define new therapeutic targets.

In sPAH, pulmonary arterial remodeling involves in particular excessive proliferation and migration of smooth muscle and endothelial cells (38). Our previous *in vitro* and *in vivo* results showed a role of NGF in these mechanisms, thus suggesting NGF as an interesting therapeutic target in pulmonary arterial remodeling. Our present results in the sPAH model confirm this hypothesis, by showing a role of NGF in pulmonary arterial remodeling at medial and intimal levels (wall thickness and luminal occlusion, respectively). These results are also in line with previous data of the literature, showing NGF ability to induce *in vitro* proliferation of smooth muscle (39) or endothelial cells (40) from other origins than the lung.

Several *in vitro* data of the literature suggest a role of both NGF receptors in tissue remodeling. The TrkA receptor is already known to participate in NGF-induced airway smooth muscle cell proliferation (41). NGF activates both TrkA and p75^{NTR} receptors to induce endothelial cell migration *in vitro* (40). In our previous study, we have shown that pulmonary

arterial smooth muscle cell proliferation induced by NGF involves activation of the TrkA receptor, whereas NGF-induced proliferation of pulmonary arterial endothelial cells involves both TrkA and p75^{NTR} receptors (11). Our present results show that treatment either with K252a or with anti-p75^{NTR} blocking antibodies of sPAH rats can inhibit intima and media remodeling in pulmonary arteries, thus confirming for the first time *in vivo* the participation of both TrkA and p75^{NTR} receptors in pulmonary arterial remodelling.

Conclusion

In conclusion, by use of a pertinent model of sPAH in the rat, our present study confirms that NGF may be an interesting therapeutic target in PH, even in severe forms of the disease. We have shown, for the first time *in vivo*, a role of both TrkA and p75^{NTR} receptors activated by NGF to contribute to PH pathophysiology, thus suggesting that targeting NGF itself may offer better therapeutic benefits rather than trying to selectively target one of its receptors. The ongoing development of anti-NGF immunotherapy in human pain may therefore be an interesting new therapeutic option to consider in human severe PH.

List of abbreviations:

PAH: pulmonary arterial hypertension

PH: pulmonary hypertension

mPAP: mean pulmonary arterial pressure

sPAH: severe pulmonary arterial hypertension

MCT: monocrotaline

Hx: hypoxia

CTRL: control

RV: right ventricle

LV: left ventricle

S: septum

IL-1 β : interleukin -1 β

TNF- α : tumor necrosis factor α

SEM: standard error of the mean

Ethics approval and consent to participate: All animal studies were made according to European and French directives about vertebrate animals protection use for animal experiments. Agreement was obtained from French authorities (number A33-063-907) and all the protocols used were approved by the local ethics committee (Comité d'éthique regional d'Aquitaine, protocol number: 50110016-A).

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and materials: The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article.

Competing interests: On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Funding/Sources of support:

This work was supported by INSERM and University of Bordeaux

Authors' contributions: Conception and design: F.C., V.F.M.; Analysis and interpretation: F.C., V.F.M.; Drafting the manuscript for important intellectual content: F.C., V.F.M.; Revising the manuscript for important intellectual content: F.C., R.M., B.M., V.F.M.; final approval of the manuscript: F.C., C.G., M.D., A.C., R.M., J.P.S., B.M., V.F.M.

Acknowledgments: The authors thank Mrs M. Lepiez, Mrs E. Poinama and Mrs F. estella for excellent animal care, and Dr C. Toussaint and Mrs M. Campagnac for their technical assistance with mPAP measurements. The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging.

References

1. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European respiratory journal* 2015; 46: 903-975.
2. 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, Primary Pulmonary Hypertension Study G. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1996; 334: 296-301.
3. Perros F, Dorfmuller P, Montani D, Hammad H, Waelput W, Girerd B, Raymond N, Mercier O, Mussot S, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Lambrecht BN. Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 311-321.
4. Guignabert C, Tu L, Le Hir M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, Huertas A, Humbert M, Montani D. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2013; 22: 543-551.
5. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43: 25S-32S.
6. Galie N, Barbera JA, Frost AE, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Peacock AJ, Simonneau G, Vachiery JL, Grunig E, Oudiz RJ, Vonk-Noordegraaf A, White RJ, Blair C, Gillies H, Miller KL, Harris JH, Langley J, Rubin LJ, Investigators A. Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England journal of medicine* 2015; 373: 834-844.
7. Lau EM, Tamura Y, McGoon MD, Sitbon O. The 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: a practical chronicle of progress. *The European respiratory journal* 2015; 46: 879-882.
8. Hoeper MM. Combination or monotherapy for pulmonary arterial hypertension? *The Lancet Respiratory medicine* 2016; 4: 247-249.
9. Lajoie AC, Lauziere G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *The Lancet Respiratory medicine* 2016; 4: 291-305.
10. Tuder RM, Archer SL, Dorfmuller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D4-12.
11. Freund-Michel V, Cardoso Dos Santos M, Guignabert C, Montani D, Phan C, Coste F, Tu L, Dubois M, Girerd B, Courtois A, Humbert M, Savineau JP, Marthan R, Muller B. Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental

- Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015; 192: 342-355.
12. Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacology & therapeutics* 2008; 117: 52-76.
 13. Perros F, Montani D, Dorfmuller P, Durand-Gasselien I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Herve P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008; 178: 81-88.
 14. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Dartevielle P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *The Journal of clinical investigation* 2009; 119: 512-523.
 15. Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevielle P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011; 45: 311-322.
 16. Montani D, Perros F, Gambaryan N, Girerd B, Dorfmuller P, Price LC, Huertas A, Hammad H, Lambrecht B, Simonneau G, Launay JM, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 184: 116-123.
 17. Hameed AG, Arnold ND, Chamberlain J, Pickworth JA, Paiva C, Dawson S, Cross S, Long L, Zhao L, Morrell NW, Crossman DC, Newman CM, Kiely DG, Francis SE, Lawrie A. Inhibition of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) reverses experimental pulmonary hypertension. *The Journal of experimental medicine* 2012; 209: 1919-1935.
 18. Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, Ohnishi K, Masuda H, Dahan D, Takeya M, Guibert C, Marthan R. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *Journal of vascular research* 2012; 49: 33-42.
 19. de Vries A, Engels F, Henricks PA, Leusink-Muis T, McGregor GP, Braun A, Groneberg DA, Dessing MC, Nijkamp FP, Fischer A. Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2006; 36: 1192-1200.
 20. Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, Terzano C, Cardillo G, Amenta F, Bronzetti E. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004; 30: 12-19.
 21. Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, Gunther S, Girerd B, Jais X, Algalarrondo V, Price LC, Savale L, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & therapeutics* 2014; 141: 172-191.
 22. Kwapiszewska G, Chwalek K, Marsh LM, Wygrecka M, Wilhelm J, Best J, Egemnazarov B, Weisel FC, Osswald SL, Schermuly RT, Olschewski A, Seeger W, Weissmann N, Eickelberg O, Fink L. BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* 2012; 181: 2018-2029.
 23. He Y, Cao X, Liu X, Li X, Xu Y, Liu J, Shi J. Quercetin reverses experimental pulmonary arterial hypertension by modulating the TrkA pathway. *Experimental cell research* 2015; 339: 122-134.

24. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M. Management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 65: 1976-1997.
25. Novoyatleva T, Schymura Y, Janssen W, Strobl F, Swiercz JM, Patra C, Posern G, Wietelmann A, Zheng TS, Schermuly RT, Engel FB. Deletion of Fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction. *Basic research in cardiology* 2013; 108: 325.
26. Kimura K, Ieda M, Kanazawa H, Yagi T, Tsunoda M, Ninomiya S, Kurosawa H, Yoshimi K, Mochizuki H, Yamazaki K, Ogawa S, Fukuda K. Cardiac sympathetic rejuvenation: a link between nerve function and cardiac hypertrophy. *Circulation research* 2007; 100: 1755-1764.
27. Lam NT, Currie PD, Lieschke GJ, Rosenthal NA, Kaye DM. Nerve growth factor stimulates cardiac regeneration via cardiomyocyte proliferation in experimental heart failure. *PloS one* 2012; 7: e53210.
28. Wei K, Liu L, Xie F, Hao X, Luo J, Min S. Nerve growth factor protects the ischemic heart via attenuation of the endoplasmic reticulum stress induced apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *International journal of medical sciences* 2015; 12: 83-91.
29. Caporali A, Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiological reviews* 2009; 89: 279-308.
30. Meloni M, Caporali A, Graiani G, Lagrasta C, Katare R, Van Linthout S, Spillmann F, Campesi I, Madeddu P, Quaini F, Emanuelli C. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circulation research* 2010; 106: 1275-1284.
31. Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Graiani G, Pani E, Cristofaro B, Newby AC, Madeddu P, Emanuelli C. Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell death and differentiation* 2008; 15: 299-311.
32. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43: 13S-24S.
33. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010; 122: 920-927.
34. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995; 151: 1628-1631.
35. Cracowski JL, Chabot F, Labarere J, Faure P, Degano B, Schwebel C, Chaouat A, Reynaud-Gaubert M, Cracowski C, Sitbon O, Yaici A, Simonneau G, Humbert M. Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 2014; 43: 915-917.
36. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77: 1627-1652.
37. Williams KS, Killebrew DA, Clary GP, Seawell JA, Meeker RB. Differential regulation of macrophage phenotype by mature and pro-nerve growth factor. *Journal of neuroimmunology* 2015; 285: 76-93.
38. Chaouat AaH, M. Pulmonary vascular remodeling. *La lettre du Pneumologue* 2003; 6: 19-25.
39. Kraemer R, Nguyen H, March KL, Hempstead B. NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different

- biological responses. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999; 19: 1041-1050.
40. Rahbek UL, Dissing S, Thomassen C, Hansen AJ, Tritsaris K. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2005; 450: 355-361.
41. Freund-Michel V, Bertrand C, Frossard N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cellular signalling* 2006; 18: 621-627.

Figure legends

Figure 1

A) Secretion of NGF by pulmonary arteries measured in controls rats (CTRL), or after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx). NGF was evaluated by ELISA and expressed as pg NGF/ml of supernatant after 24h of incubation in a culture medium. Data represent means \pm SEM with n=6 rats per group. **p<0.01 *versus* controls.

B-C) Mean pulmonary arterial pressure (mPAP in mmHg) measured in controls rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated either (B) preventively (prev) or (C) curatively (cur) with anti-NGF blocking antibodies (+ Ab NGF, 10 μ g/kg ip). Data represent means \pm SEM with n=10-20 rats per group. ***p<0.001 *versus* controls; ###p<0.001 *versus* MCT+Hx.

D-E) Right ventricular hypertrophy expressed as the Fulton index (= Ratio of right ventricle weight (RV) to left ventricle plus septum weight (LV + S)) in the same experimental groups in (D) preventive (prev) or (E) curative (cur) protocols. Data represent means \pm SEM with n=10-20 rats per group. ***p<0.001 *versus* controls; ##p<0.01 and ###p<0.001 *versus* MCT+Hx.

Figure 2

A-B) Mean pulmonary arterial pressure (mPAP in mmHg) measured in controls rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats curatively treated by either (A) K252a (+ K252a, TrkA tyrosine kinase inhibitor, 80 μ g/kg) or (B) anti-p75^{NTR} blocking antibodies (+ Ab p75, 10 μ g/kg ip). Data represent means \pm SEM with n=10-20 rats per group. **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* controls; ###p<0.001 *versus* MCT+Hx.

C-D) Right ventricular hypertrophy expressed as the Fulton index (= Ratio of right ventricle weight (RV) to left ventricle plus septum weight (LV + S)) in the same experimental groups curatively treated by either (C) K252a (inhibitor of TrkA) or (D) anti-p75^{NTR} blocking antibodies (+ Ab p75). Data represent means \pm SEM with n=10-20 rats per group. ***p<0.001 *versus* controls; ###p<0.001 *versus* MCT+Hx.

Figure 3

A-B) Secretion of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) by pulmonary arteries in control rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated with anti-NGF blocking antibodies either (A) preventively (prev), or (B) curatively (cur).

C-D) Secretion of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) by pulmonary arteries in control rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated curatively with either (C) K252a (inhibitor of TrkA), or (D) anti-p75^{NTR} blocking antibodies (+ Ab p75).

Cytokines were determined by ELISA (results expressed as pg cytokine/ml supernatant after 24h of incubation in the culture medium and presented as a percentage of cytokine secretion compared to controls). Data represent means \pm SEM with n=6-12 rats per group. **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* controls; ###p<0.001 *versus* MCT+Hx.

Figure 4

A-B) Percentage of wall thickness. C-D) Luminal occlusion score.

A, C) Remodeling of rat pulmonary microarteries (less than 50 μ m in diameter) in control rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated with anti-NGF blocking antibodies either preventively (prev), or curatively (cur).

B, D) Remodeling of rat pulmonary microarteries (less than 50µm in diameter) in control rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated with either K252a (TrkA inhibitor), or anti-p75^{NTR} blocking antibodies (+ Ab p75).

A-D) Results are presented as means ± SEM with n=6-12 rats per group. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* controls; #p<0.05 and ####p<0.001 *versus* MCT+Hx.

E) Representative cross-sectional views of remodeled pulmonary microarteries (1: CTRL; 2: MCT+Hx; 3: MCT+Hx+Ab NGF; 4: MCT+Hx+K252a; 5: MCT+Hx+Ab p75) showing wall thickening and luminal occlusion, after hematoxylin and eosin staining, with scale bars representing 10µm.

Figure 1 suppl

A-B) Secretion of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) by pulmonary arteries in control rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated with anti-NGF blocking antibodies either (A) preventively (prev), or (B) curatively (cur). Cytokines were determined by ELISA (results expressed as pg cytokine/ml supernatant after 24h of incubation in the culture medium and presented as a percentage of cytokine secretion compared to controls). Data represent means ± SEM with n=6-12 rats per group. ***p<0.001 *versus* controls; ###p<0.001 *versus* MCT+Hx.

Figure 2 suppl

A-B) Remodeling of rat pulmonary microarteries (between 50 and 100µm in diameter) in control rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated with anti-NGF blocking antibodies either (A) preventively (prev), or (B) curatively (cur).

C) Remodeling of rat pulmonary microarteries (between 50 and 100 μ m in diameter) in control rats (CTRL), after combination of MCT and 4 weeks of hypoxia (MCT+Hx), or in MCT+Hx rats treated either with K252a (TrkA inhibitor), or with anti-p75^{NTR} blocking antibodies (+ Ab p75).

A-C) Results are presented as means \pm SEM with n=6-12 rats per group. ***p<0.001 *versus* controls; ##p<0.01 and ###p<0.001 *versus* MCT+Hx.

D) Representative cross-sectional views of remodeled pulmonary microarteries (1: CTRL; 2: MCT+Hx; 3: MCT+Hx+Ab NGF; 4: MCT+Hx+K252a; 5: MCT+Hx+Ab p75) showing wall thickening (hematoxylin and eosin staining). Scale bars represent 10 μ m.

Fig. 1

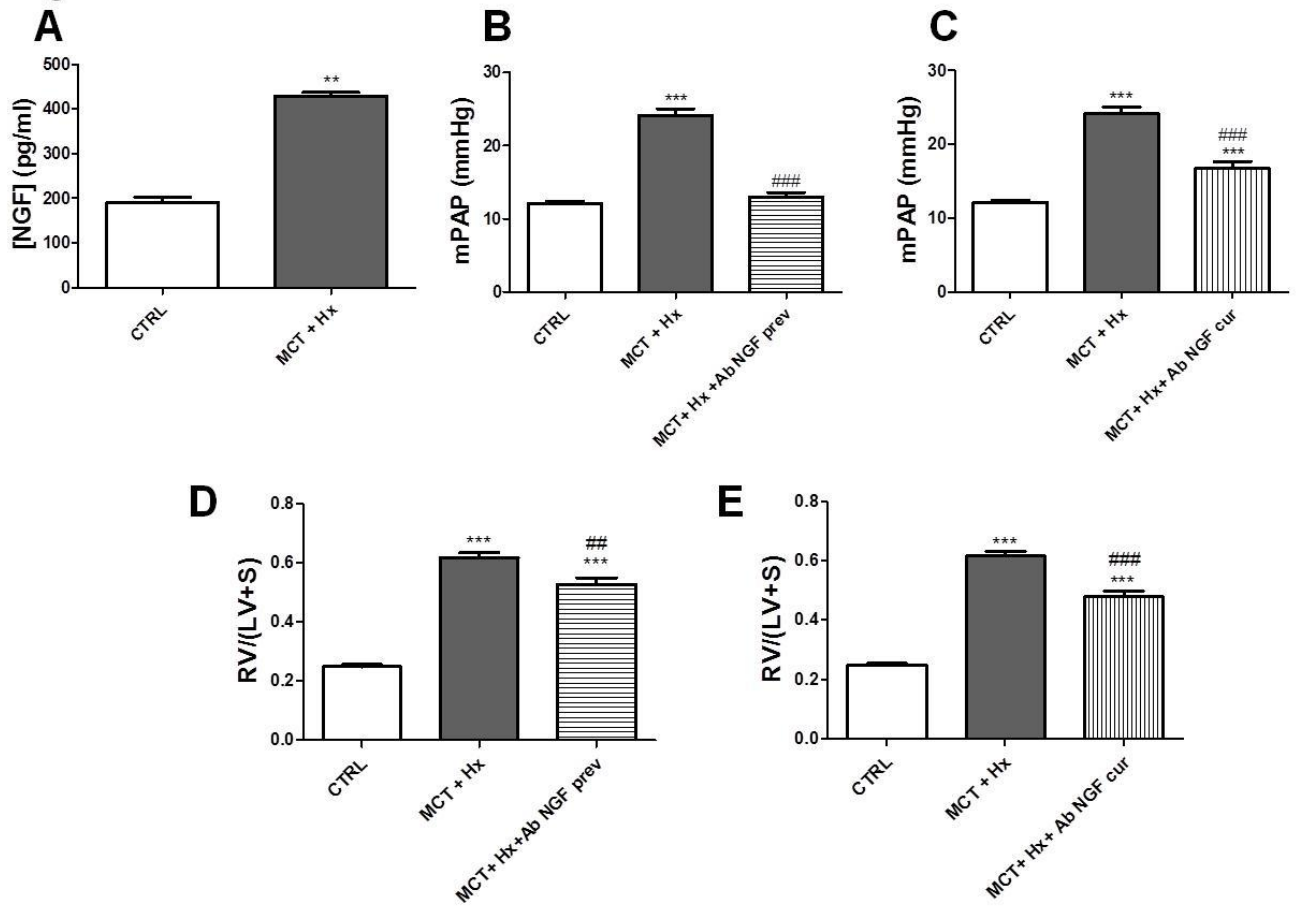


Fig. 2

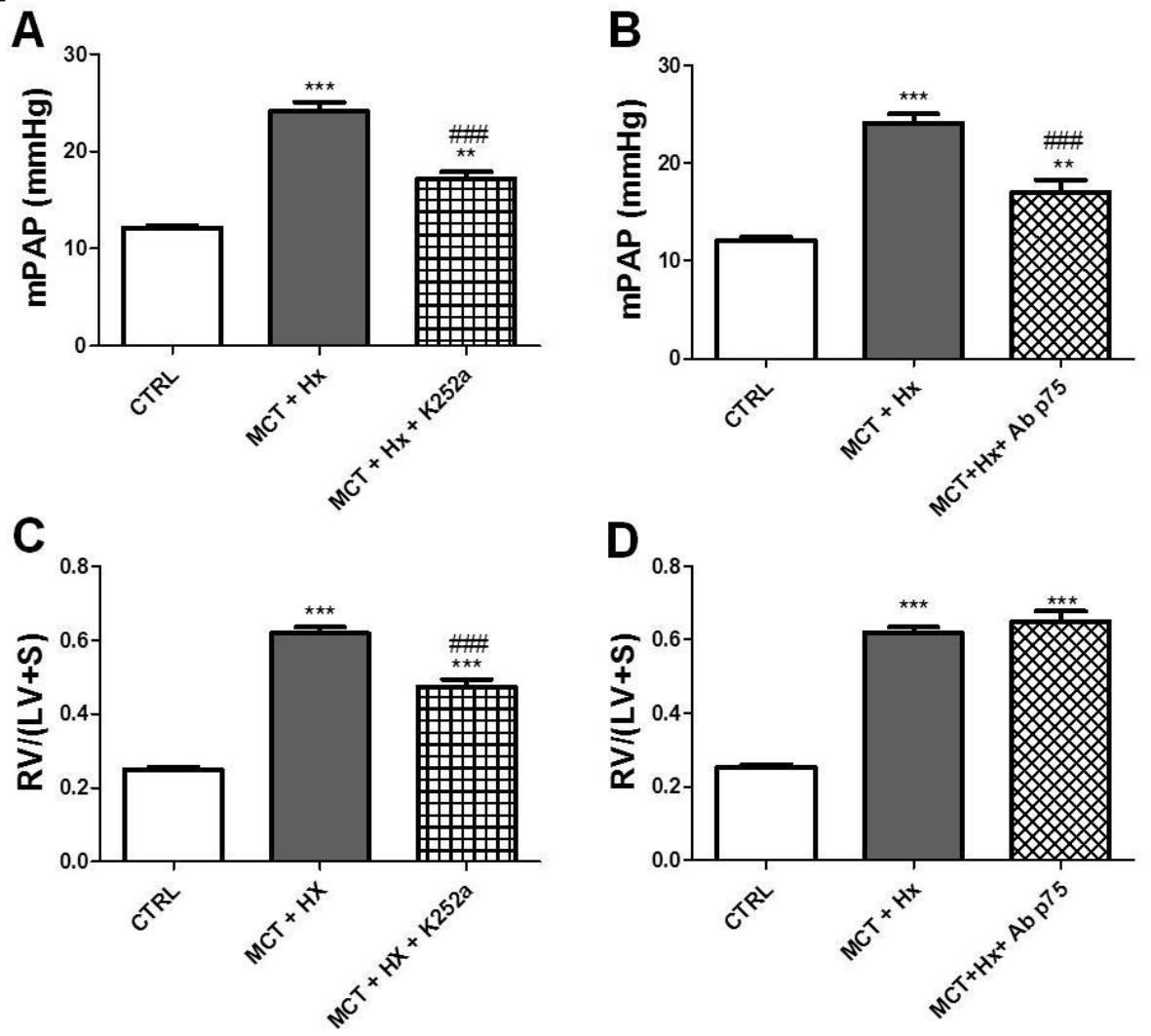
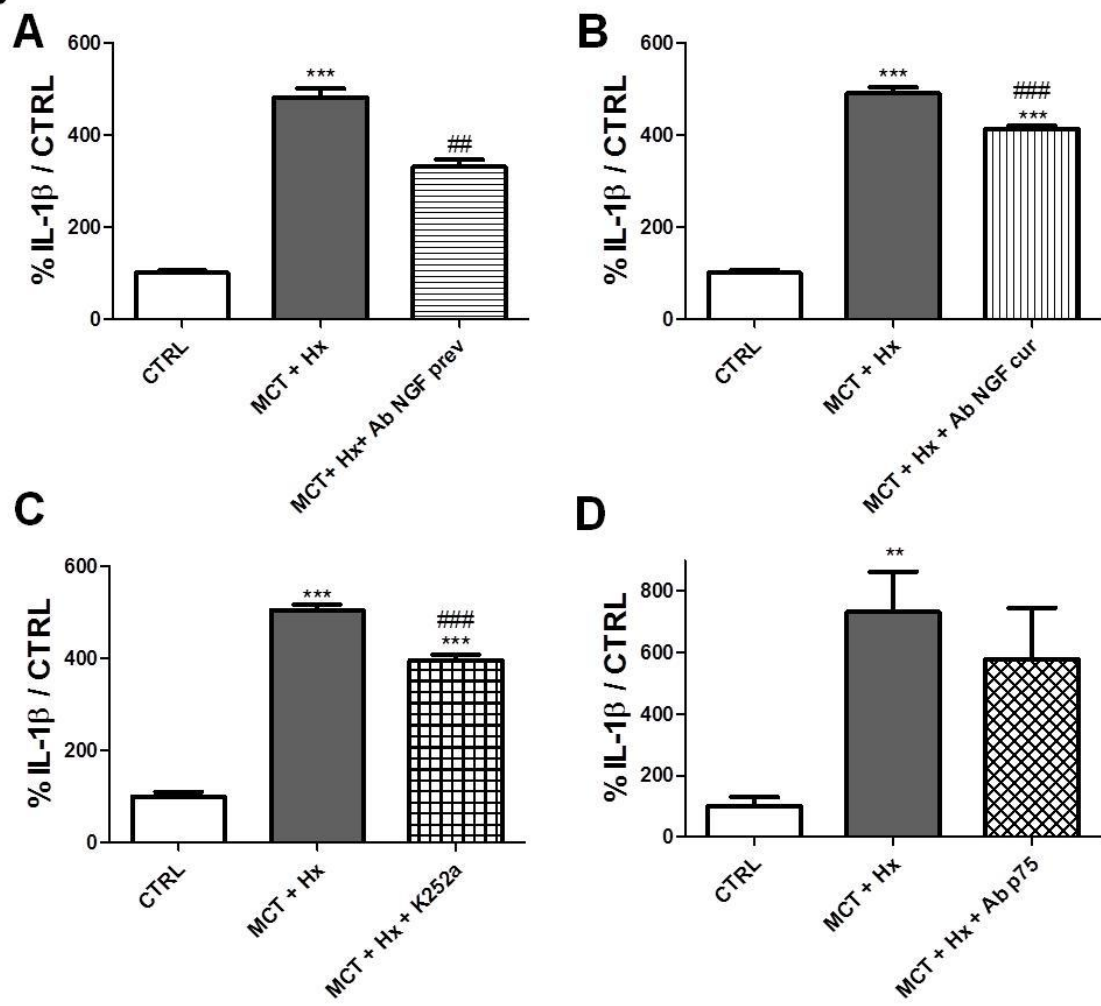


Fig. 3



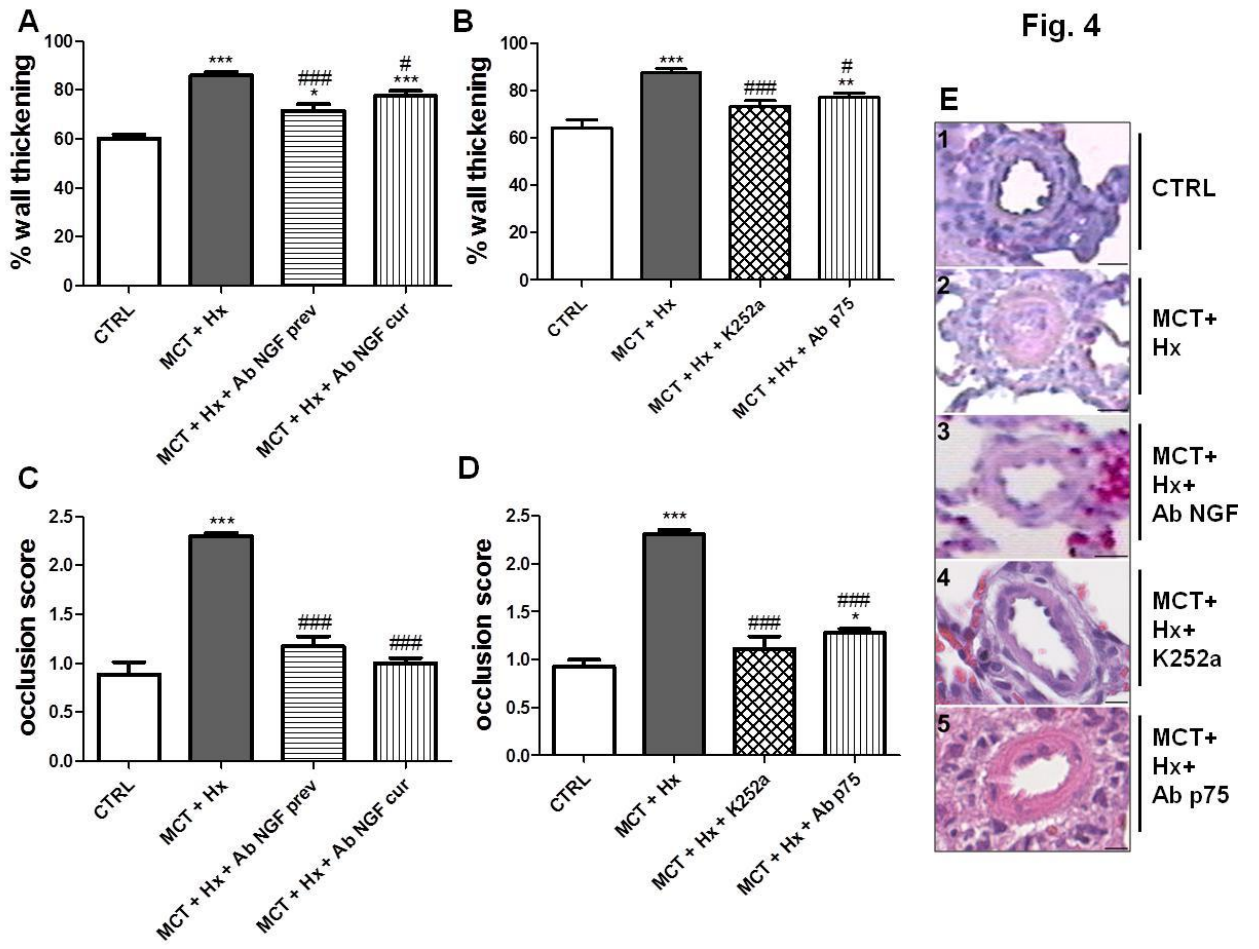
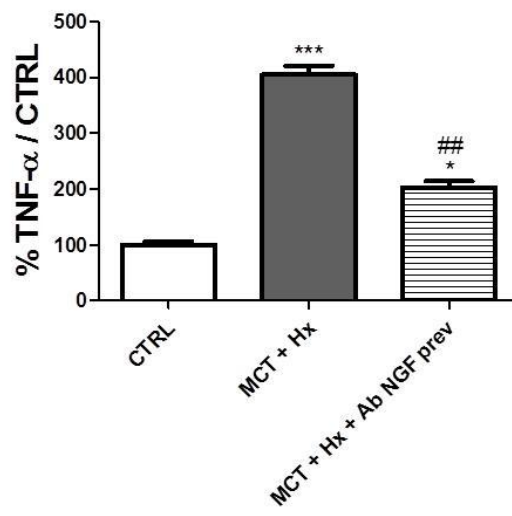


Fig. suppl. 1

A



B

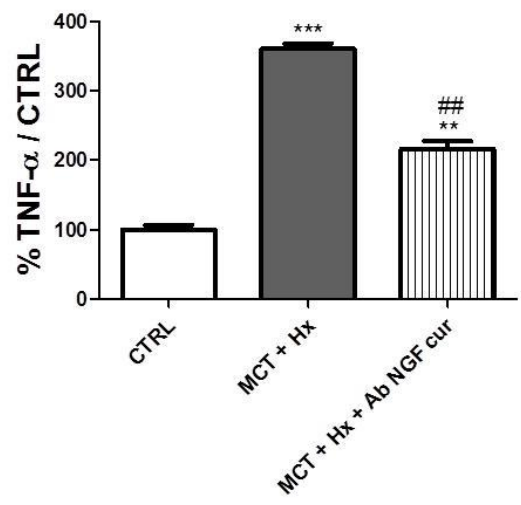
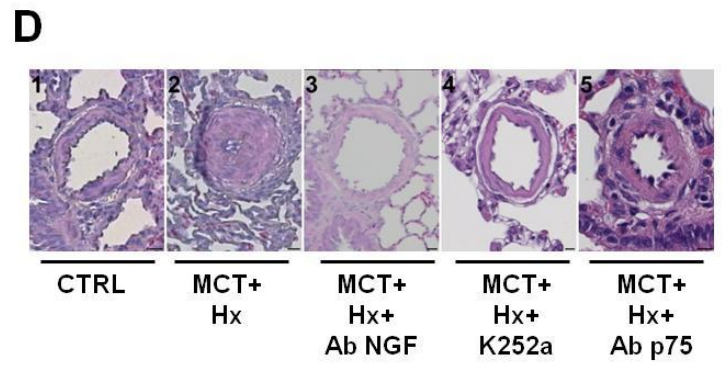
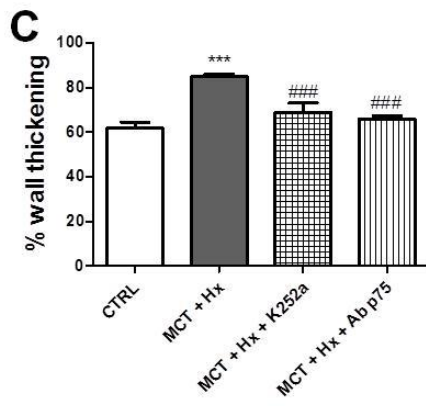
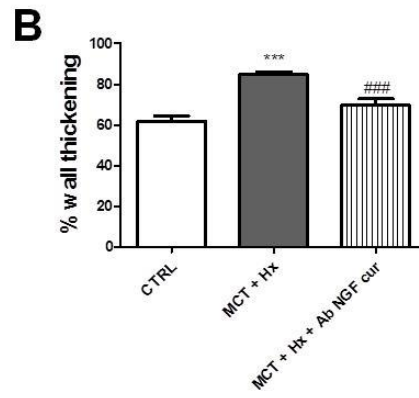
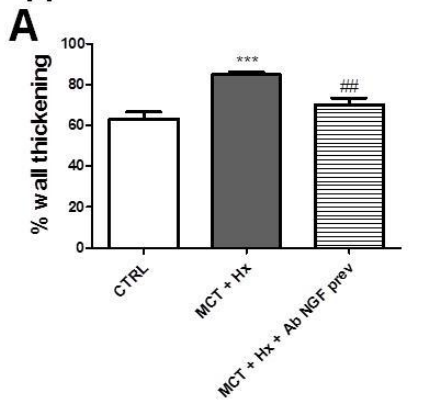


Fig. suppl. 2



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis, à l'aide d'une approche translationnelle chez l'Homme et chez le rat, de mieux comprendre la physiopathologie des différents types d'HTP. D'un point de vue diagnostique, les études menées chez l'Homme ont permis de définir des paramètres quantifiables par tomодensitométrie utiles au diagnostic clinique. En parallèle, les études expérimentales menées chez le rat ont confirmé l'intérêt d'un modèle d'HTAPs reproduisant les caractéristiques physiopathologiques de la maladie humaine, et ont contribué à l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique, le NGF, dans l'HTP et l'HTAPs.

Apport de la tomодensitométrie dans la compréhension de la physiopathologie de l'HTP et aide au diagnostic

Mon travail observationnel chez l'Homme a consisté à utiliser la tomодensitométrie afin de mieux caractériser la physiopathologie de l'HTP, en particulier l'HTP associée à la BPCO. En effet, la BPCO est une maladie qui peut se compliquer d'HTP ou plus rarement d'HTAPs. Ces complications surviennent selon des mécanismes méconnus. Par ailleurs, le diagnostic de certitude de l'HTP nécessite un cathétérisme cardiaque droit qui est une technique invasive comportant des risques. C'est pourquoi il est intéressant de rechercher des techniques diagnostiques non invasives.

Notre premier travail utilisant la tomодensitométrie a permis pour la première fois de mettre en évidence une relation entre le remodelage bronchique et la PAPm chez les patients atteints de BPCO (137) [**Publication N°1**]. Les études précédentes s'étaient principalement intéressées au rôle de l'emphysème dans le développement de l'HTP chez les patients atteints de BPCO. Dans notre étude, l'analyse multivariée indique que l'épaisseur de la paroi bronchique est le facteur le mieux corrélé aux variations de PAPm, en comparaison avec le ratio du diamètre artériel pulmonaire sur l'aorte et la PaO₂, ou encore avec les paramètres

d'EFR. De plus, à l'aide d'une quantification totalement automatisée de l'emphysème, aucune corrélation n'a été trouvée entre cette caractéristique physiopathologique et la PAPm.

Notre deuxième article a permis de démontrer que la tomodensitométrie est un outil très utile pour prédire la PAPm chez les patients atteints de BPCO associée ou non à une HTPs (131) [**Publication N°2**]. Selon nos résultats en analyse multivariée, les trois paramètres les mieux corrélés à la PAPm sont le pourcentage d'aire des petits vaisseaux pulmonaires normalisé par la surface pulmonaire (ou %CSA), l'épaississement de la paroi bronchique (WT) et la PaO₂. En particulier, chez les patients atteints de BPCO avec une HTPs, le paramètre le mieux corrélé à la PAPm est le %CSA, alors qu'il s'agit du WT chez les patients atteints de BPCO sans HTPs. Ces trois paramètres identifiés ont été combinés afin de définir un score, utile pour prédire l'absence d'HTPs chez les patients souffrant de BPCO. Nous avons pu confirmer l'intérêt clinique de notre score dans une cohorte plus large de 105 patients souffrant de BPCO.

Les travaux réalisés dans ces deux articles ont ainsi permis de mieux comprendre les facteurs responsables de l'apparition de l'HTP ou de l'HTPs dans la population souffrant de BPCO. Ils ont également permis d'identifier des paramètres quantifiables de manière objective par tomodensitométrie pouvant être utiles au diagnostic.

Toutefois, quelques limitations persistent dans ces études. En particulier, il s'agit d'études observationnelles et rétrospectives, ce qui nous empêche de conclure quant à une relation de causalité entre l'épaississement de la paroi bronchique ou l'augmentation de la surface des petits vaisseaux et l'augmentation de la PAPm. De plus, le nombre faible de patients et le biais de recrutement lié aux études faites dans un centre de référence de l'HTP représentent une autre limite, puisque les patients compliqués d'HTP représentent au moins 50% des BPCO dans nos études, ce qui ne correspond pas à la prévalence dans la population. Toutefois Wells *et al* ont récemment montré que 31% d'une grande population de BPCO avaient à la fois un élargissement du ratio de l'artère pulmonaire sur l'aorte et une augmentation de l'épaisseur de la paroi bronchique (128). Cette même équipe avait déjà montré que l'élargissement de l'artère pulmonaire normalisé par l'aorte pouvait prédire l'HTP dans la BPCO (276).

Il serait très intéressant de pouvoir confirmer nos résultats dans une nouvelle cohorte prospective de préférence multicentrique. Puisque la prévalence des HTPs associées à la

BPCO est faible (37, 39-41), il est important de mieux caractériser ces patients dont les études réalisées jusqu'à maintenant portaient sur des effectifs insuffisants (39, 40, 84). L'étude du score que nous avons défini serait d'autant plus intéressante qu'il est déjà connu que l'HTP, et à plus forte raison l'HTPs, est de mauvais pronostic chez les patients BPCO (36, 39, 277). Ce score, qui a été défini afin de pouvoir prédire un diagnostic, pourrait aussi être utile pour prédire un pronostic. Ainsi, ce type d'outil est très précieux afin d'envisager la prise en charge de ces patients, d'autant plus que ceux atteints de BPCO compliquée d'HTPs font actuellement l'objet de nombreux essais cliniques (278) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02774928 , ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01116063) et de plusieurs publications récentes (125, 279, 280). En particulier, une étude a déjà été menée chez des patients atteints de BPCO, dans le but de prédire et d'évaluer par tomодensitométrie un traitement ciblant l'HTAP avec un suivi du %CSA et du pourcentage d'emphysème (281). L'efficacité des traitements ciblant l'HTAP différencie cette population des patient atteints de BPCO sans HTPs, qui ne bénéficient généralement pas de ce type de traitement, car ils entraînent une vasodilatation et pourraient alors entraîner une aggravation du rapport ventilation/perfusion (282, 283). Enfin, dans une cohorte prospective, il nous serait également possible d'établir des liens de causalité entre l'élévation de la PAPm et l'épaississement bronchique chez les patients atteints de BPCO associée à une HTP modérée, ou entre une augmentation de la surface des petits vaisseaux (%CSA) et une HTPs.

Développement d'un modèle animal pertinent d'HTAP sévère

En parallèle au développement de nouveaux outils non invasifs pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints d'HTP, il ne faut pas oublier qu'à l'heure actuelle il n'existe pas de traitement curatif de l'HTP ni de l'HTAP. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste un enjeu majeur dans cette pathologie. Toutefois, pour tester de nouveaux traitements, il est important de pouvoir s'appuyer sur des modèles animaux fiables et mimant les différents aspects de la pathologie humaine. Cette recherche de modèles animaux est d'autant plus importante dans l'HTP qu'il est difficile d'obtenir des tissus ou cellules d'origine humaine.

Dans ce contexte, notre travail a donc consisté à caractériser un modèle d'HTAP sévère (HTAPs) chez le rat combinant une injection unique de monocrotaline (MCT) associée à quatre semaines d'hypoxie chronique (Hx) (Coste *et al.*, en soumission) [**Publication n°3**]. Ce modèle présente une augmentation de la PAPm, un remodelage cardiaque intense, de même qu'une inflammation, une hyperréactivité et un remodelage des artères pulmonaires. Plus précisément, il est possible d'observer un épaississement de la paroi artérielle pulmonaire, une occlusion luminale, mais aussi la présence de lésions spécifiques ressemblant fortement à celles observées dans l'HTAPs humaine telles que les lésions thrombotiques, plexiformes, néointimales excentriques et concentriques non laminaires. Ce modèle a donc l'avantage d'utiliser deux procédures faciles à mettre en œuvre et de ne nécessiter que quatre semaines pour observer le développement du phénotype d'HTAPs. Il reproduit de très nombreux aspects de la maladie humaine, notamment le développement de certaines lésions anatomopathologiques difficile à retrouver dans des modèles animaux, et en particulier les lésions plexiformes et thrombotiques qui sont observées dans ce modèle. Ce modèle pourrait donc être d'une grande utilité afin d'approfondir l'étude des mécanismes physiopathologiques de l'HTAPs et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Si les modèles animaux sont indispensables à l'étude des maladies, et en particulier dans l'HTP à cause de la difficulté d'obtention de cellules ou de tissus humains, il reste important de garder à l'esprit que les modèles animaux possèdent de nombreuses limites, malgré leurs capacités à pouvoir mimer de nombreux aspects clefs de l'HTP humaine. C'est également le cas de ce modèle, qui associe deux procédures simples mais présentant chacune des inconvénients. Notamment, l'utilisation de la monocrotaline, seule (76) [**Publication n°4**] ou en association avec un autre traitement, par exemple une exposition à une hypoxie chronique (Coste *et al.*, en préparation) [**Publication n°5**], nécessite de garder un esprit critique vis-à-vis des résultats obtenus. En effet, la MCT a pour inconvénients de ne pas toucher que les vaisseaux pulmonaires, et de nécessiter une biotransformation hépatique associée avec d'éventuelles variations interindividuelles. De plus, la MCT seule est un modèle dans lequel les traitements testés au préalable sont souvent efficaces pour traiter l'HTAP, contrairement à ce qui est observé ensuite au cours des essais cliniques chez l'Homme (142, 145). L'hypoxie chronique représente elle aussi un modèle d'intérêt dans l'étude de l'HTP. Toutefois, quand les animaux sont sortis du caisson, les altérations pathologiques sont réversibles, contrairement à ce qui est observé dans la pathologie humaine (284).

Malgré ces limites, le modèle développé ici, associant deux procédures simples à mettre en œuvre, permet d'obtenir un modèle sévère mimant une HTAP de stade avancé chez l'Homme, ce qui pourrait être intéressant car l'HTAP chez l'Homme est très souvent diagnostiquée tardivement quand la maladie est déjà très avancée (12). Ce modèle pourrait alors être d'une grande utilité à la fois dans l'étude de ces caractéristiques physiopathologiques sévères, ainsi que dans la recherche et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Enfin, la combinaison de ces deux procédures permettant de mimer un phénotype sévère chez l'Homme devrait être plus représentatif des éventuelles résistances aux traitements observées dans l'HTAPs humaine, et pourrait ainsi permettre d'augmenter les chances de succès d'un traitement au stade des essais cliniques en étant plus sélectif au stade préclinique.

Identification d'une nouvelle cible thérapeutique : le NGF

Une des pistes actuelles de développement de nouveaux traitements ciblant l'HTAP est le ciblage de facteurs de croissance. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au NGF, car la littérature montrait déjà son implication dans l'inflammation, l'hyperréactivité, la migration et la prolifération cellulaires en dehors de la circulation pulmonaire. Ces différents aspects sont des phénomènes importants dans la physiopathologie de l'HTP, suggérant ainsi que le NGF pouvait être une nouvelle cible d'intérêt dans cette pathologie.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence pour la première fois une augmentation de la sécrétion et/ou de l'expression du NGF associée à une augmentation d'expression et/ou d'activation de ses récepteurs dans l'HTP humaine et dans les modèles classiques d'HTP (MCT ou Hx) (76) [**Publication n°4**], ainsi que dans le modèle d'HTAPs chez le rat associant MCT et quatre semaines d'hypoxie chronique (Coste et *al.*, en préparation) [**Publication n°5**]. Nos résultats démontrent que le NGF et sa signalisation jouent un rôle critique dans le développement et la persistance de l'HTP. En effet, les expériences menées *in vitro/ex vivo* ont démontré la capacité du NGF à induire l'hyperréactivité des artères pulmonaire isolées chez l'humain et le rat, la prolifération et la migration des cellules vasculaires pulmonaires humaines, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les artères pulmonaires

isolées de rat ou d'origine humaine, de même que par les cellules vasculaires pulmonaires humaines en culture. De plus, les expériences menées *in vivo* montrent que l'inhibition du NGF par des anticorps bloquants anti-NGF administrés dans les modèles classiques d'HTP, de même que dans le modèle d'HTAPs, permet de prévenir et même d'inhiber l'HTP dans un protocole de type curatif. Dans ces expériences *in vivo*, l'inhibition du NGF diminue le remodelage, l'hyperréactivité, et l'inflammation des artères pulmonaires. Ainsi, nos résultats suggèrent que cibler le NGF dans l'HTP pourrait permettre de réduire l'hyperréactivité artérielle pulmonaire, un aspect déjà traité par les thérapies actuelles, mais permettrait également de cibler l'inflammation artérielle pulmonaire et de réduire les remodelages cardiaque et artériel pulmonaire, ces deux derniers aspects physiopathologiques étant particulièrement difficiles à inhiber avec les thérapies disponibles actuellement.

Dans le modèle d'HTAPs chez le rat, nos résultats démontrent un rôle du NGF dans la physiopathologie de cette maladie par l'activation de ses deux récepteurs : le récepteur TrkA et le récepteur p75^{NTR}. Si peu d'études se sont intéressées au ciblage potentiel du récepteur p75^{NTR}, un intérêt particulier a été porté au récepteur TrkA dans l'optique de développer de nouveaux traitements antalgiques. En effet, le NGF est impliqué dans la transmission de la sensation douloureuse via l'activation du récepteur TrkA, et le blocage de ce récepteur induit des effets antalgiques (285). Dans notre étude, afin de cibler le récepteur TrkA, nous avons utilisé le composé K252a, un inhibiteur de tyrosine-kinase. Si cet inhibiteur permet d'étudier expérimentalement l'implication du récepteur TrkA, son manque de sélectivité peut conduire à l'inhibition d'autres tyrosine-kinases, en particulier celles des autres récepteurs Trk (récepteurs TrkB et TrkC) (286). D'autres inhibiteurs du récepteur TrkA ont donc été développés, soit pour inhiber son activité tyrosine-kinase, soit pour empêcher la liaison du NGF à ce récepteur. Les molécules ciblant l'activité enzymatique intracellulaire de la tyrosine-kinase du récepteur TrkA doivent avoir une petite taille ou être reliées à un peptide ayant la capacité de pouvoir lui faire traverser la membrane plasmique. L'un de ces peptides, le peptide Tat (YGRKKRRQRRR) a par exemple déjà été utilisé pour développer un inhibiteur de l'activité du TrkA (l'inhibiteur IPTRK3) (287). Toutefois, cet inhibiteur possède lui aussi des problèmes de spécificité. Il existe d'autres molécules décrites dans la littérature qui sont soit capables de bloquer l'activité enzymatique du TrkA, comme le composé NMS-P626 ou un oligonucléotide antisens dirigé contre le récepteur TrkA, soit capables d'inhiber la liaison du NGF au récepteur TrkA, comme le composé ALE0540, la molécule de fusion

TrkA-IgG ou un anticorps anti-TrkA (MNAC13) (288). Toutefois, l'ensemble de ces molécules possède le même souci de manque de sélectivité, qui a empêché jusqu'à présent leur développement en clinique. La recherche continue actuellement pour essayer de développer de petites molécules capables d'inhiber sélectivement le récepteur TrkA.

Nos résultats démontrant l'implication des deux récepteurs du NGF dans notre modèle d'HTAPs chez le rat, il serait donc plus intéressant de cibler le NGF directement. Dans cette optique, l'utilisation d'anticorps bloquants anti-NGF, comme nous l'avons fait dans nos expériences, pourrait être une stratégie intéressante à envisager chez l'Homme. En effet, l'utilisation d'anticorps à visée thérapeutique est une stratégie thérapeutique en plein essor. Ces anticorps possèdent de nombreux avantages, entre autres une bonne capacité de diffusion du fait de leur petite taille et de leurs propriétés hydrophiles (289), mais aussi une forte affinité pour leurs cibles.

Des anticorps bloquants anti-NGF (tanezumab, fasinumab et fulranumab) ont déjà été développés dans l'optique d'une utilisation thérapeutique chez l'Homme, et font déjà l'objet de nombreux essais cliniques notamment dans le cadre du traitement de certaines douleurs, dans des maladies telles que l'ostéoarthrite (290-292), la sciatique aiguë (293), et les lombalgies chroniques (294).

Concernant les effets indésirables potentiels de ce type de traitement, l'utilisation d'anticorps en thérapeutique peut être limitée par des réactions d'immunisation. Pour l'instant, ce phénomène n'a pas été décrit pour les anticorps anti-NGF actuellement en cours d'essais cliniques, qui sont d'ailleurs sous une forme humanisée (tanezumab) ou humaine (fasinumab et fulranumab) afin de limiter l'apparition de telles réactions d'immunisation. De plus, ces formes permettent également d'augmenter leur demi-vie. Des effets indésirables ont été signalés lors des essais cliniques, tels que des hypoesthésies, des paresthésies, ou des œdèmes périphériques (285). De plus, en 2010, l'apparition de certains effets indésirables plus graves tels que de l'ostéonécrose, de l'ostéoarthrose progressant rapidement et l'apparition de fractures sous-chondrales a conduit à l'arrêt de tous les essais cliniques impliquant les anticorps ciblant le NGF (menés à l'époque avec le tanezumab par Pfizer et le fulranumab par Janssen). Une commission mandatée par la FDA (« Food and Drug Administration ») en 2012 a enquêté sur ces effets et a conclu en faveur de la poursuite des essais cliniques impliquant

des anticorps anti-NGF, sous couvert de précautions particulières, notamment la réduction au minimum de l'utilisation concomitante d'AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) et un suivi radiologique poussé avant même l'inclusion des patients dans les protocoles curatifs (288, 295, 296). Les sujets susceptibles de recevoir les traitements visant à bloquer le NGF ne doivent pas avoir de pathologies connues pouvant mener à une ostéoarthrite, une fracture sous-chondrale ou à une destruction articulaire (296). Les essais cliniques ont repris depuis fin 2013 et sept essais sont recensés actuellement dans la prise en charge de différentes douleurs (cinq essais en phase 3 pour le tanezumab, quatre essais en phase 3 pour le fulranumab, et deux essais de phase 3 pour le fasinumab). Ainsi, si l'efficacité et la sécurité de ces médicaments se confirment, leur utilisation pourrait être envisagée dans d'autres pathologies où le NGF joue un rôle délétère, comme c'est le cas dans l'HTP.

Toutefois, un autre paramètre à prendre en compte sera également le coût de ce nouveau traitement potentiel. En effet, ce coût risque d'être élevé, comme c'est très souvent le cas pour les biothérapies. Par exemple, le traitement par anticorps monoclonaux dans la polyarthrite rhumatoïde peut coûter jusqu'à 24 000 \$ (environ 22 000 €) par an et par patient. Dans le cadre du traitement de la douleur, un traitement par anticorps anti-NGF serait donc beaucoup plus cher qu'un traitement avec des antalgiques tels que les AINS par exemple. Il pourrait néanmoins trouver sa place dans le traitement de douleurs réfractaires aux autres traitements antalgiques, ou dans le cadre de la prise en charge aiguë de certaines douleurs (285). Dans le cadre d'un traitement de l'HTP, ce coût reste néanmoins « raisonnable » en comparaison à certains autres traitements, en particulier au traitement par injection intraveineuse continue de prostacycline dont le coût peut atteindre 150 000 à 300 000 € par an et par patient. Il faut néanmoins noter que l'apparition sur le marché de traitements de l'HTP par voie orale a permis de réduire considérablement ces coûts (297). La place éventuelle de telles thérapies anti-NGF dans le traitement de l'HTP serait donc à définir en fonction de ces différents paramètres, se positionnant peut-être en seconde intention dans des formes très avancées de la maladie ou des formes continuant à progresser malgré l'utilisation d'une combinaison thérapeutique d'autres traitements.

Perspectives expérimentales

Dans l'optique d'une éventuelle nouvelle stratégie thérapeutique ciblant le NGF dans l'HTP, nous souhaitons poursuivre notre travail afin de mieux comprendre son rôle dans la physiopathologie de cette maladie. En particulier, nous souhaitons approfondir les mécanismes cellulaires et moléculaires activés par le NGF et participant d'une part au remodelage artériel pulmonaire, et d'autre part aux altérations de la réactivité artérielle pulmonaire.

Mécanismes mis en jeu par le NGF dans la migration des cellules vasculaires pulmonaires : rôle potentiel des métalloprotéinases de matrice.

Le remodelage artériel pulmonaire est le paramètre physiopathologique le plus difficile à traiter dans l'HTP. Nous avons pu mettre en évidence un rôle du NGF dans ce remodelage, en caractérisant notamment les récepteurs et voies de signalisation mises en jeu dans la prolifération des cellules vasculaires pulmonaires. Nous avons également montré que le NGF stimulait la migration des cellules endothéliales et musculaires lisses artérielles pulmonaires humaines. Nous souhaitons à présent approfondir les mécanismes activés par le NGF dans cet effet, en nous intéressant plus particulièrement à un rôle potentiel des métalloprotéinases de matrice (MMP) -2 et -9.

En effet, les MMP-2 (ou gélatinase A) et -9 (ou gélatinase B) appartiennent au groupe des gélatinases dont l'activité protéolytique s'exerce sur la gélatine et les collagènes de type IV et V de la membrane basale. L'expression de ces MMP -2 et -9 est augmentée dans l'HTP humaine et dans les modèles animaux classiques d'HTP (hypoxie chronique ou monocrotaline) et ces MMPs sont impliquées dans le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTP, notamment dans le remodelage de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la prolifération et la migration cellulaires (298). De plus, des données de la littérature montrent que le NGF peut moduler l'expression et/ou l'activité des MMP -2 et/ou -9 dans les CML bronchiques humaines (299), ou dans des cellules vasculaires d'autres origines que le poumon (300, 301). Enfin, dans un modèle d'asthme sévère chez le rat, un dépôt accru de collagène a été mis en évidence dans les parois des voies aériennes. Ce dépôt est potentialisé par l'administration de NGF, et cette étude a suggéré une augmentation de l'activité de la MMP-9

par le NGF dans les tissus pulmonaires pour expliquer cet effet (302). Ainsi, les MMPs sont impliquées dans le remodelage artériel pulmonaire, de même que le NGF, et l'ensemble de ces études suggère une interaction potentielle entre NGF et MMPs dans ce remodelage. L'étude des effets du NGF sur l'expression et/ou l'activité des MMP-2 et -9, *in vitro* dans les cellules vasculaires pulmonaires en culture, *ex vivo* et *in vivo* dans les artères pulmonaires, pourrait ainsi permettre de mieux comprendre le rôle du NGF dans le remodelage artériel pulmonaire et d'affiner son ciblage thérapeutique potentiel dans l'HTP et en particulier dans l'HTAPs.

Mécanismes mis en jeu par le NGF dans l'hyperréactivité artérielle pulmonaire

Les altérations de la réactivité artérielle pulmonaire jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'HTP. Nos résultats ont démontré un rôle du NGF et de ses deux récepteurs dans cet aspect physiopathologique de l'HTP. Si des effets de certains facteurs de croissance ont déjà été étudiés sur la réactivité artérielle pulmonaire, sa régulation par le NGF est un résultat nouveau que nous avons pu mettre en évidence. L'implication de ses deux récepteurs, le récepteur TrkA et le récepteur p75^{NTR}, est également surprenante, et nous souhaiterions à présent approfondir l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires activés par le NGF en aval de ses récepteurs pour contribuer à l'hyperréactivité artérielle pulmonaire. Plusieurs hypothèses de mécanismes pourraient être évaluées dans cette optique.

Le traitement par les anticorps anti-NGF exerce une action sur la contraction induite à la fois par la PHE et par la PGF2 α , suggérant que le NGF pourrait être impliqué dans un mécanisme commun en aval de leurs récepteurs. En effet, si la PHE et la PGF2 α n'ont pas les mêmes récepteurs, elles activent toutes les deux en aval de leur récepteur une voie de signalisation conduisant à la contraction des CML. Cette voie met en jeu une phospholipase C β . Les phospholipases C β ont la capacité enzymatique de cliver le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Ces seconds messagers entraînent la libération de calcium au niveau intracellulaire. Ce calcium peut ensuite lier la calmoduline pour former un complexe alors capable d'activer la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK : « myosin light chain kinase »). Cette dernière va phosphoryler la chaîne légère de la myosine. La myosine peut alors interagir avec l'actine et provoquer la contraction

de la cellule. Le NGF, via l'activation du récepteur TrkA, entraîne l'activation d'une phospholipase $C\gamma$, qui conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium via la même cascade d'activation décrite ci-dessus avec la PHE et la $PGF2\alpha$ (246). Une première hypothèse pour expliquer l'implication du NGF dans l'hyperréactivité serait que ces voies de signalisation identiques puissent se potentialiser. Ainsi lorsque le NGF est inhibé, la potentialisation de cette voie le serait aussi.

Toutefois, l'hyperréactivité à la PHE induite par le NGF est totalement inhibée par les anticorps bloquants anti-NGF, alors que la réactivité à la $PGF2\alpha$ induite par le NGF n'est, elle, que partiellement inhibée par ce traitement. Ces résultats laissent envisager qu'un mécanisme activé par le NGF augmente spécifiquement l'effet de la PHE et pourrait également être impliqué. Une augmentation d'expression des récepteurs de la PHE, les récepteurs α_1 -adrénergiques, a été mise en évidence dans le modèle hypoxique chronique (303). Une telle augmentation d'expression des récepteurs α_1 -adrénergiques peut également être induite par le NGF dans certains tissus (304). Ainsi le NGF, qui est sécrété en grandes quantités dans les artères pulmonaires dans l'HTP, pourrait entraîner une augmentation d'expression des récepteurs α_1 -adrénergiques, et ainsi contribuer à l'hyperréactivité des artères pulmonaires à la PHE observée dans nos expériences. Cette hypothèse pourra être validée *in vivo* en comparant l'expression des récepteurs α_1 -adrénergiques dans les artères pulmonaires des rats contrôles, des rats atteints d'HTPs et ceux traités à l'aide des anticorps anti-NGF.

Par ailleurs, il a été montré que le NGF est capable d'activer, par l'intermédiaire de son récepteur TrkA, la voie de la petite protéine G RhoA et sa kinase ROCK (RhoA kinase) (305). Cette voie RhoA/ROCK est activée de manière excessive dans l'HTP (166, 167) et induit un mécanisme de sensibilisation au calcium en inhibant la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP : « myosin light chain phosphatase »). Ce mécanisme est en faveur de la formation de myosine phosphorylée alors capable d'interagir avec l'actine afin de faire contracter plus facilement la cellule, sans modification des concentrations intracellulaires de calcium. Ainsi, le NGF pourrait également induire une hyperréactivité des artères pulmonaires en contribuant à cette sensibilisation de l'appareil contractile par l'activation de la petite protéine G RhoA dans l'HTP.

Le NGF pourrait également réguler l'expression et/ou l'activité de certains récepteurs TRP (« Transient receptor potential »), et en particulier certains récepteurs TRPV (« Transient receptor potential vanilloid ») pour contribuer à l'altération de la réactivité vasculaire pulmonaire dans l'HTP. Les récepteurs TRPV sont capables de laisser passer les molécules cationiques dans la cellule et sont particulièrement perméables au passage du calcium. Ils sont ainsi impliqués dans la régulation du tonus myogénique des artères pulmonaires, en régulant la contraction physiologique des CML artérielles pulmonaires (306). De plus, l'expression des récepteurs TRPV1 et TRPV4 dans les CML artérielles pulmonaires augmente en hypoxie chronique (307, 308). Une étude a également montré que la vasoconstriction induite par l'hypoxie est diminuée de manière significative chez les souris mutées pour le gène codant pour le récepteur TRPV4 (309). En parallèle, des études ont pu mettre en évidence un effet du NGF sur l'expression et/ou l'activité de ces récepteurs. En effet, il a été montré dans une souris surexprimant le NGF au niveau de l'urothélium que l'expression du récepteur TRPV4 était augmentée dans le bas du tractus urinaire (310). Le NGF peut également induire l'activation du TRPV1 dans les cellules neuronales (311). Ainsi, le NGF pourrait aussi contribuer à l'hyperréactivité vasculaire pulmonaire en induisant l'augmentation d'expression et/ou d'activité de ces récepteurs dans les artères pulmonaires.

Enfin, nous avons pu montrer l'implication du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ dans l'hyperréactivité vasculaire pulmonaire. Très peu d'études se sont intéressées pour l'instant à un rôle potentiel de ce récepteur dans les modifications de réactivité vasculaire. A notre connaissance, une seule étude a mis en évidence un rôle du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ dans la régulation de la vasomotricité pulmonaire, en démontrant que le tonus vasculaire pulmonaire basal et la réponse à des agents contractiles étaient augmentés chez les souris dont le gène codant pour le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ avait été invalidé (253). Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle régulateur « bénéfique » du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ dans la réactivité vasculaire pulmonaire, contrairement à ce que nous avons pu observer dans nos expériences. Les souris dont le gène codant pour le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ étant disponibles commercialement, il serait intéressant dans nos expériences futures de les utiliser et de les placer en hypoxie chronique, afin de confirmer nos résultats obtenus avec les anticorps bloquants anti- $p75^{\text{NTR}}$.

CONCLUSION

CONCLUSION

Nos travaux ont permis par une approche translationnelle menées chez l'Homme et chez le rat de mieux comprendre la physiopathologie de l'HTP, de contribuer au développement de nouvelles techniques de diagnostic, et du point de vue expérimental de caractériser un modèle animal pertinent d'HTAP sévère, utilisé avec d'autres modèles plus classiques afin d'identifier une nouvelle cible thérapeutique, le NGF.

A l'aide de la tomодensitométrie, nous avons pu confirmer que la BPCO est une maladie systémique, avec des interactions complexes entre les systèmes respiratoires et cardio-vasculaires. L'étude de tous les composants pulmonaires (voies aériennes, parenchyme, mais aussi vaisseaux) est importante pour définir de façon plus précise des phénotypes de BPCO parmi la vaste hétérogénéité de cette maladie. L'étude par tomодensitométrie est d'autant plus importante que l'échographie peut être sujette à des erreurs lors de l'estimation des PAP. Un modèle multivarié incluant la mesure quantitative par tomодensitométrie du remodelage bronchique, de l'augmentation de la surface des petits vaisseaux pulmonaires et de la PaO₂ pourrait être une bonne alternative afin d'évaluer de manière non invasive l'HTP ou l'HTPs dans la BPCO. De plus, ces outils non invasifs pourraient permettre d'évaluer l'effet d'éventuels traitements sur les remodelages bronchique ou artériel dans le cadre d'essais thérapeutiques.

En parallèle, nous avons approfondi la caractérisation d'un modèle sévère d'HTAPs chez le rat combinant injection de monocrotaline et placement en hypoxie chronique pendant quatre semaines. Ce modèle présente des caractéristiques physiopathologiques plus sévères que les modèles animaux classiques d'HTP et des lésions non présentes dans ces modèles classiques, mais retrouvées dans l'HTAPs humaine. Ainsi, ce modèle paraît pertinent dans le but de mieux comprendre la physiopathologie de l'HTAPs et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

En partie grâce au développement de ce modèle animal, nous avons pu mettre en évidence un rôle du NGF dans la physiopathologie de l'HTP et de l'HTAPs. En effet, nos résultats expérimentaux montrent que le NGF participe *in vivo* à l'inflammation, à l'hyperréactivité et au remodelage des artères pulmonaires, trois altérations physiopathologiques majeures dans l'HTP. Le NGF pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans l'HTP, même sévère. Avec le développement récent

d'anticorps bloquants anti-NGF comme nouvelle stratégie thérapeutique dans la prise en charge de la douleur, ce type de traitement pourrait ainsi rapidement être également adapté à l'HTP.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux ont contribué à l'amélioration des connaissances scientifiques actuelles dans l'hypertension pulmonaire, en envisageant de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques originales. En apportant des éléments de réponse à des problématiques diagnostiques et thérapeutiques actuelles dans l'HTP, ces études pourraient ainsi déboucher sur des évolutions permettant un diagnostic plus précis ainsi qu'une amélioration de la prise en charge des patients, de leur pronostic et donc de leur qualité de vie.

RÉFÉRENCES

REFERENCES :

1. Cumming G, Harding K, Horsfield K, Preston S. Gas diffusion in the lung. *Clinical science* 1970; 38: 19P.
2. McLaughlin RF, Jr., Tyler WS, Canada RO. Subgross pulmonary anatomy of the rabbit, rat, and guinea pig, with additional notes on the human lung. *The American review of respiratory disease* 1966; 94: 380-387.
3. EA. B. Segmental anatomy of the lungs. . *New York: McGraw Hill* 1954.
4. Girodet PO, Dournes G, Thumerel M, Begueret H, Dos Santos P, Ozier A, Dupin I, Trian T, Montaudon M, Laurent F, Marthan R, Berger P. Calcium channel blocker reduces airway remodeling in severe asthma. A proof-of-concept study. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015; 191: 876-883.
5. Cournand A, Bloomfield RA, Lauson HD. Double lumen catheter for intravenous and intracardiac blood sampling and pressure recording. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 1945; 60: 73-75.
6. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *British journal of pharmacology* 2005; 144: 449-458.
7. Brenner O. Pathology of the vessels of the pulmonary circulation. *Arch Intern Med (Chic)* 1935; 56: 211-237.
8. Harris PaH, D. The Human Pulmonary Circulation. *ed Churchill Livingstone* 1977; 1.
9. Townsley MI. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Comprehensive Physiology* 2012; 2: 675-709.
10. Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S, Frid M. The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology* 2011; 1: 141-161.
11. 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, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D34-41.
12. Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE, Barst RJ, Benza RL, Liou TG, Turner M, Giles S, Feldkircher K, Miller DP, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* 2010; 137: 376-387.
13. Seferian A, Simonneau G. [Pulmonary hypertension: definition, diagnostic and new classification]. *Presse medicale* 2014; 43: 935-944.
14. Hoepfer MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing ZC, Gibbs JS. A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory medicine* 2016; 4: 306-322.
15. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, Nakanishi N, Miyatake K. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000; 161: 487-492.
16. Authors/Task Force M, Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoepfer M, Authors/Task Force M. 2015

- ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* 2015.
17. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European respiratory journal* 2015; 46: 903-975.
 18. Montani D, Jais X, Sitbon O, Capron F, Simonneau G, Humbert M. [Pulmonary arterial hypertension]. *Revue des maladies respiratoires* 2005; 22: 651-666.
 19. Montani D, Gunther S, Dorfmueller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, Jais X, Savale L, Artaud-Macari E, Price LC, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet journal of rare diseases* 2013; 8: 97.
 20. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Annals of internal medicine* 1987; 107: 216-223.
 21. Andersen CU, Mellekjaer S, Nielsen-Kudsk JE, Bendstrup E, Hilberg O, Simonsen U. Pulmonary hypertension in chronic obstructive and interstitial lung diseases. *International journal of cardiology* 2013; 168: 1795-1804.
 22. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D42-50.
 23. Montani D, O'Callaghan DS, Jais X, Savale L, Natali D, Redzepi A, Hoette S, Parent F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Implementing the ESC/ERS pulmonary hypertension guidelines: real-life cases from a national referral centre. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2009; 18: 272-290.
 24. Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43: 5S-12S.
 25. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 54: S55-66.
 26. McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Pulido T, Rich S, Rosenkranz S, Suissa S, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D51-59.
 27. 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, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 173: 1023-1030.
28. Moreira EM, Gall H, Leening MJ, Lahousse L, Loth DW, Krijthe BP, Kieft-de Jong JC, Brusselle GG, Hofman A, Stricker BH, Ghofrani HA, Franco OH, Felix JF. Prevalence of Pulmonary Hypertension in the General Population: The Rotterdam Study. *PloS one* 2015; 10: e0130072.
29. 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, Simonneau G. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010; 122: 156-163.
30. Farber HW, Miller DP, Poms AD, Badesch DB, Frost AE, Muros-Le Rouzic E, Romero AJ, Benton WW, Elliott CG, McGoon MD, Benza RL. Five-Year outcomes of patients enrolled in the REVEAL Registry. *Chest* 2015; 148: 1043-1054.
31. 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, Primary Pulmonary Hypertension Study G. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1996; 334: 296-301.
32. Montani D, Dorfmüller P, Maitre S, Jais X, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. [Pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis]. *Presse medicale* 2010; 39: 134-143.
33. Jain A, McNamara PJ. Persistent pulmonary hypertension of the newborn: Advances in diagnosis and treatment. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2015; 20: 262-271.
34. Vachiery JL, Adir Y, Barbera JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galie N, Ghio S, Gibbs JS, Martinez F, Semigran M, Simonneau G, Wells A, Seeger W. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D100-108.
35. Minai OA, Chaouat A, Adnot S. Pulmonary hypertension in COPD: epidemiology, significance, and management: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 2010; 137: 39S-51S.
36. Weitzenblum E, Hirth C, Ducolone A, Mirhom R, Rasaholinjanahary J, Ehrhart M. Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1981; 36: 752-758.
37. Seeger W, Adir Y, Barbera JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, De Marco T, Galie N, Ghio S, Gibbs S, Martinez FJ, Semigran MJ, Simonneau G, Wells AU, Vachiery JL. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D109-116.
38. Chaouat A, Naeije R, Weitzenblum E. Pulmonary hypertension in COPD. *The European respiratory journal* 2008; 32: 1371-1385.
39. Chaouat A, Bugnet AS, Kadaoui N, Schott R, Enache I, Ducolone A, Ehrhart M, Kessler R, Weitzenblum E. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 172: 189-194.

40. Thabut G, Dauriat G, Stern JB, Logeart D, Levy A, Marrash-Chahla R, Mal H. Pulmonary hemodynamics in advanced COPD candidates for lung volume reduction surgery or lung transplantation. *Chest* 2005; 127: 1531-1536.
41. Scharf SM, Iqbal M, Keller C, Criner G, Lee S, Fessler HE, National Emphysema Treatment Trial G. Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; 166: 314-322.
42. Matsuoka S, Washko GR, Yamashiro T, Estepar RS, Diaz A, Silverman EK, Hoffman E, Fessler HE, Criner GJ, Marchetti N, Scharf SM, Martinez FJ, Reilly JJ, Hatabu H, National Emphysema Treatment Trial Research G. Pulmonary hypertension and computed tomography measurement of small pulmonary vessels in severe emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010; 181: 218-225.
43. Criner GJ, Scharf SM, Falk JA, Gaughan JP, Sternberg AL, Patel NB, Fessler HE, Minai OA, Fishman AP, National Emphysema Treatment Trial Research G. Effect of lung volume reduction surgery on resting pulmonary hemodynamics in severe emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007; 176: 253-260.
44. Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, Maitre B, Housset B, Brandt C, Le Corvoisier P, Weitzenblum E, Eddahibi S, Adnot S. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest* 2009; 136: 678-687.
45. Patel BD, Coxson HO, Pillai SG, Agusti AG, Calverley PM, Donner CF, Make BJ, Muller NL, Rennard SI, Vestbo J, Wouters EF, Hiorns MP, Nakano Y, Camp PG, Nasute Fauerbach PV, Screaton NJ, Campbell EJ, Anderson WH, Pare PD, Levy RD, Lake SL, Silverman EK, Lomas DA, International CGN. Airway wall thickening and emphysema show independent familial aggregation in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008; 178: 500-505.
46. Coxson HO, Leipsic J, Parraga G, Sin DD. Using pulmonary imaging to move chronic obstructive pulmonary disease beyond FEV1. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2014; 190: 135-144.
47. Nakano Y, Muro S, Sakai H, Hirai T, Chin K, Tsukino M, Nishimura K, Itoh H, Pare PD, Hogg JC, Mishima M. Computed tomographic measurements of airway dimensions and emphysema in smokers. Correlation with lung function. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000; 162: 1102-1108.
48. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2004; 350: 2645-2653.
49. Weitzenblum E, Chaouat A. Severe pulmonary hypertension in COPD: is it a distinct disease? *Chest* 2005; 127: 1480-1482.
50. Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, Channick R, Darteville P, Jansa P, Lang I, Madani MM, Ogino H, Pengo V, Mayer E. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D92-99.
51. 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, Group C-S. Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 319-329.
52. 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, Souza

- R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 54: S43-54.
53. Abe K, Shinoda M, Tanaka M, Kuwabara Y, Yoshida K, Hirooka Y, McMurtry IF, Oka M, Sunagawa K. Haemodynamic unloading reverses occlusive vascular lesions in severe pulmonary hypertension. *Cardiovascular research* 2016.
54. Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D4-12.
55. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, Jessup M, Grizzle WE, Aldred MA, Cool CD, Tuder RM. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012; 186: 261-272.
56. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995; 151: 1628-1631.
57. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010; 122: 920-927.
58. Cracowski JL, Chabot F, Labarere J, Faure P, Degano B, Schwebel C, Chaouat A, Reynaud-Gaubert M, Cracowski C, Sitbon O, Yaici A, Simonneau G, Humbert M. Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 2014; 43: 915-917.
59. Joppa P, Petrasova D, Stancak B, Tkacova R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest* 2006; 130: 326-333.
60. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, Durand-Gasselien I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol AC, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; 165: 1419-1425.
61. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselien I, Godot V, Capel F, Adnot S, Eddahibi S, Mazmanian M, Fadel E, Herve P, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 2007; 29: 937-943.
62. Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, Adnot S, Eddahibi S. Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007; 176: 1041-1047.
63. 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, Hassoun PM. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D22-33.
64. Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinkel R, Fink L, Scheed A, Ritter C, Dahal BK, Vater A, Klussmann S, Ghofrani HA, Weissmann N, Klepetko W, Banat GA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012; 186: 897-908.

65. Huertas A, Tu L, Gambaryan N, Girerd B, Perros F, Montani D, Fabre D, Fadel E, Eddahibi S, Cohen-Kaminsky S, Guignabert C, Humbert M. Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 2012; 40: 895-904.
66. Ulrich S, Nicolls MR, Taraseviciene L, Speich R, Voelkel N. Increased regulatory and decreased CD8+ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2008; 75: 272-280.
67. Ormiston ML, Chang C, Long LL, Soon E, Jones D, Machado R, Treacy C, Toshner MR, Campbell K, Riding A, Southwood M, Pepke-Zaba J, Exley A, Trembath RC, Colucci F, Wills M, Trowsdale J, Morrell NW. Impaired natural killer cell phenotype and function in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2012; 126: 1099-1109.
68. Galie N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, Klepetko W, McGoon MD, McLaughlin VV, Preston IR, Rubin LJ, Sandoval J, Seeger W, Keogh A. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D60-72.
69. Raiesdana A, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *Annals of medicine* 2006; 38: 95-110.
70. Shimoda LA, Sham JS, Sylvester JT. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2000; 49: 549-560.
71. Dantzker DR, Bower JS. Pulmonary vascular tone improves VA/Q matching in obliterative pulmonary hypertension. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1981; 51: 607-613.
72. Billaud M, Dahan D, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. *Respir Res* 2011; 12: 30.
73. MacLean MR, McCulloch KM, Baird M. Effects of pulmonary hypertension on vasoconstrictor responses to endothelin-1 and sarafotoxin S6C and on inherent tone in rat pulmonary arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1995; 26: 822-830.
74. Rodat L, Savineau JP, Marthan R, Guibert C. Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2007; 454: 41-51.
75. Konik EA, Han YS, Brozovich FV. The role of pulmonary vascular contractile protein expression in pulmonary arterial hypertension. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2013; 65: 147-155.
76. Freund-Michel V, Cardoso Dos Santos M, Guignabert C, Montani D, Phan C, Coste F, Tu L, Dubois M, Girerd B, Courtois A, Humbert M, Savineau JP, Marthan R, Muller B. Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015; 192: 342-355.
77. Rafikova O, Rafikov R, Kumar S, Sharma S, Aggarwal S, Schneider F, Jonigk D, Black SM, Tofovic SP. Bosentan inhibits oxidative and nitrosative stress and rescues occlusive pulmonary hypertension. *Free radical biology & medicine* 2013; 56: 28-43.
78. Dumas de la Roque E, Savineau JP, Bonnet S. Dehydroepiandrosterone: A new treatment for vascular remodeling diseases including pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & therapeutics* 2010; 126: 186-199.

79. Bonnet S, Belus A, Hyvelin JM, Roux E, Marthan R, Savineau JP. Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001; 281: L193-201.
80. Wang J, Juhaszova M, Rubin LJ, Yuan XJ. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺ channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 1997; 100: 2347-2353.
81. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Journal of applied physiology* 2005; 98: 390-403.
82. Dipp M, Evans AM. Cyclic ADP-ribose is the primary trigger for hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat lung in situ. *Circulation research* 2001; 89: 77-83.
83. Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* 1958; 18: 533-547.
84. Carlsen J, Andersen KH, Boesgaard S, Iversen M, Steinbrüchel D, Andersen CB. Pulmonary arterial lesions in explanted lungs after transplantation correlate with severity of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2013; 32: 347-354.
85. Weitzenblum E, Chaouat A, Kessler R. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumonologia i alergologia polska* 2013; 81: 390-398.
86. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M. Management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 65: 1976-1997.
87. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43: 25S-32S.
88. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 1989; 80: 1198-1206.
89. Chaouat AaH, M. Pulmonary vascular remodeling. *La lettre du Pneumologue* 2003; 6: 19-25.
90. Bjornsson J, Edwards WD. Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. *Mayo Clinic proceedings* 1985; 60: 16-25.
91. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* 1994; 144: 275-285.
92. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010; 121: 2747-2754.
93. Guazzi M, Borlaug BA. Pulmonary hypertension due to left heart disease. *Circulation* 2012; 126: 975-990.
94. Moser KM, Bloor CM. Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest* 1993; 103: 685-692.
95. Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoepfer MM, Gottlieb J, Nickel N, Hussein K, Maus U, Lehmann U, Janciauskiene S, Welte T, Haverich A, Rische J, Kreipe H, Laenger F. Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension

- composition, architecture, and microenvironment. *The American journal of pathology* 2011; 179: 167-179.
96. Stenmark KR, Frid M, Perros F. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: An Evolving Paradigm and a Promising Therapeutic Target in PAH. *Circulation* 2016; 133: 1734-1737.
 97. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Pechoux C, Bogaard HJ, Dorfmuller P, Remy S, Lecerf F, Plante S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation* 2015; 131: 1006-1018.
 98. Hopper RK, Moonen JR, Diebold I, Cao A, Rhodes CJ, Tojais NF, Hennigs JK, Gu M, Wang L, Rabinovitch M. In Pulmonary Arterial Hypertension, Reduced BMPR2 Promotes Endothelial-to-Mesenchymal Transition via HMGA1 and Its Target Slug. *Circulation* 2016; 133: 1783-1794.
 99. Guyton AC, Lindsey AW, Gilluly JJ. The limits of right ventricular compensation following acute increase in pulmonary circulatory resistance. *Circulation research* 1954; 2: 326-332.
 100. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupuis J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, Suzuki YJ, Gladwin M, Denholm EM, Gail DB, National Heart L, Blood Institute Working Group on C, Molecular Mechanisms of Right Heart F. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 2006; 114: 1883-1891.
 101. Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, Ockaili R, McCord JM, Voelkel NF. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* 2009; 120: 1951-1960.
 102. Heath D, Cox EV, Harris-Jones JN. The clinico-pathological syndrome produced by co-existing pulmonary arterial and venous hypertension. *Thorax* 1957; 12: 321-328.
 103. Novoyatleva T, Schymura Y, Janssen W, Strobl F, Swiercz JM, Patra C, Posern G, Wietelmann A, Zheng TS, Schermuly RT, Engel FB. Deletion of Fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction. *Basic research in cardiology* 2013; 108: 325.
 104. McLaughlin VV, Gaine SP, Howard LS, Leuchte HH, Mathier MA, Mehta S, Palazzini M, Park MH, Tapsos VF, Sitbon O. Treatment goals of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: D73-81.
 105. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G, Guidelines ESCCfP. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* 2009; 30: 2493-2537.
 106. Ghofrani HA, Grimminger F. Soluble guanylate cyclase stimulation: an emerging option in pulmonary hypertension therapy. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2009; 18: 35-41.
 107. Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-

- activated protein kinase signaling cascades. *Molecular pharmacology* 1995; 48: 890-896.
108. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1992; 327: 70-75.
109. Simonneau G, Torbicki A, Hoeper MM, Delcroix M, Karlocai K, Galie N, Degano B, Bonderman D, Kurzyna M, Efficace M, Giorgino R, Lang IM. Selexipag: an oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 2012; 40: 874-880.
110. Ghofrani HA, Hoeper MM, Halank M, Meyer FJ, Staehler G, Behr J, Ewert R, Weimann G, Grimminger F. Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study. *The European respiratory journal* 2010; 36: 792-799.
111. 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, Investigators S. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 809-818.
112. Galie N, Barbera JA, Frost AE, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Peacock AJ, Simonneau G, Vachiery JL, Grunig E, Oudiz RJ, Vonk-Noordegraaf A, White RJ, Blair C, Gillies H, Miller KL, Harris JH, Langley J, Rubin LJ, Investigators A. Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England journal of medicine* 2015; 373: 834-844.
113. McLaughlin VV, Oudiz RJ, Frost A, Tapson VF, Murali S, Channick RN, Badesch DB, Barst RJ, Hsu HH, Rubin LJ. Randomized study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 174: 1257-1263.
114. Sitbon O, Jais X, Savale L, Cottin V, Bergot E, Macari EA, Bouvaist H, Dauphin C, Picard F, Bulifon S, Montani D, Humbert M, Simonneau G. Upfront triple combination therapy in pulmonary arterial hypertension: a pilot study. *The European respiratory journal* 2014; 43: 1691-1697.
115. Lau EM, Tamura Y, McGoon MD, Sitbon O. The 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: a practical chronicle of progress. *The European respiratory journal* 2015; 46: 879-882.
116. Hoeper MM. Combination or monotherapy for pulmonary arterial hypertension? *The Lancet Respiratory medicine* 2016; 4: 247-249.
117. Lajoie AC, Lauziere G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *The Lancet Respiratory medicine* 2016; 4: 291-305.
118. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M, Aboyans V, Vaz Carneiro A, Achenbach S, Agewall S, Allanore Y, Asteggiano R, Paolo Badano L, Albert Barbera J, Bouvaist H, Bueno H, Byrne RA, Carerj S, Castro G, Erol C, Falk V, Funck-Brentano C, Gorenflo M, Granton J, Jung B, Kiely DG, Kirchhof P, Kjellstrom B, Landmesser U, Lekakis J, Lionis C, Lip GY, Orfanos SE, Park MH, Piepoli MF, Ponikowski P, Revel MP, Rigau D, Rosenkranz S, Voller H, Luis Zamorano J. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the

- Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* 2016; 37: 67-119.
119. British Cardiac Society G, Medical Practice C, approved by the British Thoracic S, the British Society of R. Recommendations on the management of pulmonary hypertension in clinical practice. *Heart* 2001; 86 Suppl 1: I1-13.
 120. Dweik RA, Rounds S, Erzurum SC, Archer S, Fagan K, Hassoun PM, Hill NS, Humbert M, Kawut SM, Krowka M, Michelakis E, Morrell NW, Stenmark K, Tudor RM, Newman J, Phenotypes ATSCoPH. An official American Thoracic Society Statement: pulmonary hypertension phenotypes. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2014; 189: 345-355.
 121. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF, Jr., Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 127: 355-360.
 122. Burgel PR, Paillasseur JL, Caillaud D, Tillie-Leblond I, Chanez P, Escamilla R, Court-Fortune I, Perez T, Carre P, Roche N, Initiatives BSC. Clinical COPD phenotypes: a novel approach using principal component and cluster analyses. *The European respiratory journal* 2010; 36: 531-539.
 123. Barbera JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal* 2003; 21: 892-905.
 124. Blanco I, Piccari L, Barbera JA. Pulmonary vasculature in COPD: The silent component. *Respirology* 2016.
 125. Calcaianu G, Canuet M, Schuller A, Enache I, Chaouat A, Kessler R. Pulmonary Arterial Hypertension-Specific Drug Therapy in COPD Patients with Severe Pulmonary Hypertension and Mild-to-Moderate Airflow Limitation. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2016; 91: 9-17.
 126. Hoepfer MM, Lee SH, Voswinckel R, Palazzini M, Jais X, Marinelli A, Barst RJ, Ghofrani HA, Jing ZC, Opitz C, Seyfarth HJ, Halank M, McLaughlin V, Oudiz RJ, Ewert R, Wilkens H, Kluge S, Bremer HC, Baroke E, Rubin LJ. Complications of right heart catheterization procedures in patients with pulmonary hypertension in experienced centers. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48: 2546-2552.
 127. Cohen-Kaminsky S, Nakhleh M, Perros F, Montani D, Girerd B, Garcia G, Simonneau G, Haick H, Humbert M. A proof of concept for the detection and classification of pulmonary arterial hypertension through breath analysis with a sensor array. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013; 188: 756-759.
 128. Wells JM, Washko GR, Han MK, Abbas N, Nath H, Mamary AJ, Regan E, Bailey WC, Martinez FJ, Westfall E, Beaty TH, Curran-Everett D, Curtis JL, Hokanson JE, Lynch DA, Make BJ, Crapo JD, Silverman EK, Bowler RP, Dransfield MT, Investigators CO, Investigators ES. Pulmonary arterial enlargement and acute exacerbations of COPD. *The New England journal of medicine* 2012; 367: 913-921.
 129. Rajaram S, Swift AJ, Condliffe R, Johns C, Elliot CA, Hill C, Davies C, Hurdman J, Sabroe I, Wild JM, Kiely DG. CT features of pulmonary arterial hypertension and its major subtypes: a systematic CT evaluation of 292 patients from the ASPIRE Registry. *Thorax* 2015; 70: 382-387.

130. Dean KE, Lin F, Kampaktsis PN, George MP, Giambrone A, Coya AB, Juluru K. Semi-automated Quantification of Lung Density on Chest CT Used as a Predictive Biomarker of Pulmonary Venous Hypertension. *Academic radiology* 2016.
131. Coste F, Dournes G, Dromer C, Blanchard E, Freund-Michel V, Girodet PO, Montaudon M, Baldacci F, Picard F, Marthan R, Berger P, Laurent F. CT evaluation of small pulmonary vessels area in patients with COPD with severe pulmonary hypertension. *Thorax* 2016.
132. Matsuoka S, Yamashiro T, Washko GR, Kurihara Y, Nakajima Y, Hatabu H. Quantitative CT assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Radiographics* 2010; 30: 55-66.
133. Berger P, Perot V, Desbarats P, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Laurent F. Airway wall thickness in cigarette smokers: quantitative thin-section CT assessment. *Radiology* 2005; 235: 1055-1064.
134. Montaudon M, Berger P, de Dietrich G, Braquelaire A, Marthan R, Tunon-de-Lara JM, Laurent F. Assessment of airways with three-dimensional quantitative thin-section CT: in vitro and in vivo validation. *Radiology* 2007; 242: 563-572.
135. Montaudon M, Lederlin M, Reich S, Begueret H, Tunon-de-Lara JM, Marthan R, Berger P, Laurent F. Bronchial measurements in patients with asthma: comparison of quantitative thin-section CT findings with those in healthy subjects and correlation with pathologic findings. *Radiology* 2009; 253: 844-853.
136. Ostridge K, Wilkinson TM. Present and future utility of computed tomography scanning in the assessment and management of COPD. *The European respiratory journal* 2016.
137. Dournes G, Laurent F, Coste F, Dromer C, Blanchard E, Picard F, Baldacci F, Montaudon M, Girodet PO, Marthan R, Berger P. Computed tomographic measurement of airway remodeling and emphysema in advanced chronic obstructive pulmonary disease. Correlation with pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015; 191: 63-70.
138. Marcus JT, Vonk Noordegraaf A, Roeleveld RJ, Postmus PE, Heethaar RM, Van Rossum AC, Boonstra A. Impaired left ventricular filling due to right ventricular pressure overload in primary pulmonary hypertension: noninvasive monitoring using MRI. *Chest* 2001; 119: 1761-1765.
139. Reiter G, Reiter U, Kovacs G, Olschewski H, Fuchsjager M. Blood flow vortices along the main pulmonary artery measured with MR imaging for diagnosis of pulmonary hypertension. *Radiology* 2015; 275: 71-79.
140. Rain S, Handoko ML, Trip P, Gan CT, Westerhof N, Stienen GJ, Paulus WJ, Ottenheijm CA, Marcus JT, Dorfmuller P, Guignabert C, Humbert M, Macdonald P, Dos Remedios C, Postmus PE, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS. Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2013; 128: 2016-2025, 2011-2010.
141. Darsaklis K, Dickson ME, Cornwell W, 3rd, Ayers CR, Torres F, Chin KM, Matulevicius S. Right atrial emptying fraction non-invasively predicts mortality in pulmonary hypertension. *The international journal of cardiovascular imaging* 2016.
142. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2009; 297: L1013-1032.
143. Hilliker KS, Bell TG, Roth RA. Pneumotoxicity and thrombocytopenia after single injection of monocrotaline. *The American journal of physiology* 1982; 242: H573-579.

144. Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *The American journal of physiology* 1980; 239: H692-702.
145. Naeije R, Dewachter L. [Animal models of pulmonary arterial hypertension]. *Revue des maladies respiratoires* 2007; 24: 481-496.
146. Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F, Sliwa K. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary circulation* 2013; 3: 739-756.
147. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001; 15: 427-438.
148. Farkas D, Alhussaini AA, Kraskauskas D, Kraskauskiene V, Cool CD, Nicolls MR, Natarajan R, Farkas L. Nuclear factor kappaB inhibition reduces lung vascular lumen obliteration in severe pulmonary hypertension in rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2014; 51: 413-425.
149. Alzoubi A, Toba M, Abe K, O'Neill KD, Rocic P, Fagan KA, McMurtry IF, Oka M. Dehydroepiandrosterone restores right ventricular structure and function in rats with severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2013; 304: H1708-1718.
150. Casserly B, Mazer JM, Vang A, Harrington EO, Klinger JR, Rounds S, Choudhary G. C-type natriuretic peptide does not attenuate the development of pulmonary hypertension caused by hypoxia and VEGF receptor blockade. *Life sciences* 2011; 89: 460-466.
151. Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, Voelkel NF, McMurtry IF. Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circulation research* 2007; 100: 923-929.
152. Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD. The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *The Journal of clinical investigation* 1996; 98: 434-442.
153. Okada K, Tanaka Y, Bernstein M, Zhang W, Patterson GA, Botney MD. Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* 1997; 151: 1019-1025.
154. Dorfmueller P, Chaumais MC, Giannakouli M, Durand-Gasselien I, Raymond N, Fadel E, Mercier O, Charlotte F, Montani D, Simonneau G, Humbert M, Perros F. Increased oxidative stress and severe arterial remodeling induced by permanent high-flow challenge in experimental pulmonary hypertension. *Respiratory research* 2011; 12: 119.
155. Happe CM, de Raaf MA, Rol N, Schalij I, Vonk-Noordegraaf A, Westerhof N, Voelkel NF, de Man FS, Bogaard HJ. Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2016; 310: L1088-1097.
156. White RJ, Meoli DF, Swarhout RF, Kallop DY, Galaria, II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, Cool CD, Taubman MB. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007; 293: L583-590.

157. Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, Ohnishi K, Masuda H, Dahan D, Takeya M, Guibert C, Marthan R. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *Journal of vascular research* 2012; 49: 33-42.
158. Lan B, Hayama E, Kawaguchi N, Furutani Y, Nakanishi T. Therapeutic efficacy of valproic acid in a combined monocrotaline and chronic hypoxia rat model of severe pulmonary hypertension. *PloS one* 2015; 10: e0117211.
159. Guibert C, Marthan R, Savineau JP. 5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004; 286: L1228-1236.
160. Eddahibi S, Adnot S. The serotonin pathway in pulmonary hypertension. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 2006; 99: 621-625.
161. Shah SJ, Gomberg-Maitland M, Thenappan T, Rich S. Selective serotonin reuptake inhibitors and the incidence and outcome of pulmonary hypertension. *Chest* 2009; 136: 694-700.
162. Kawut SM, Horn EM, Berekashvili KK, Lederer DJ, Widlitz AC, Rosenzweig EB, Barst RJ. Selective serotonin reuptake inhibitor use and outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2006; 19: 370-374.
163. Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2005; 111: 2812-2819.
164. Dhalla IA, Juurlink DN, Gomes T, Granton JT, Zheng H, Mamdani MM. Selective serotonin reuptake inhibitors and pulmonary arterial hypertension: a case-control study. *Chest* 2012; 141: 348-353.
165. Sadoughi A, Roberts KE, Preston IR, Lai GP, McCollister DH, Farber HW, Hill NS. Use of selective serotonin reuptake inhibitors and outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2013; 144: 531-541.
166. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106: 57-62.
167. Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, McMurtry IF, Oka M. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; 171: 494-499.
168. Abe K, Tawara S, Oi K, Hizume T, Uwatoku T, Fukumoto Y, Kaibuchi K, Shimokawa H. Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2006; 48: 280-285.
169. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circulation research* 2004; 94: 385-393.
170. Gosal K, Dunlop K, Dhaliwal R, Ivanovska J, Kantores C, Desjardins JF, Connelly KA, McNamara PJ, Jain A, Jankov RP. Rho kinase mediates right ventricular systolic dysfunction in rats with chronic neonatal pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2015; 52: 717-727.
171. Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A, Shimokawa H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart* 2005; 91: 391-392.

172. Ishikura K, Yamada N, Ito M, Ota S, Nakamura M, Isaka N, Nakano T. Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2006; 70: 174-178.
173. Fukumoto Y, Yamada N, Matsubara H, Mizoguchi M, Uchino K, Yao A, Kihara Y, Kawano M, Watanabe H, Takeda Y, Adachi T, Osanai S, Tanabe N, Inoue T, Kubo A, Ota Y, Fukuda K, Nakano T, Shimokawa H. Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2013; 77: 2619-2625.
174. Tamosiuniene R, Tian W, Dhillon G, Wang L, Sung YK, Gera L, Patterson AJ, Agrawal R, Rabinovitch M, Ambler K, Long CS, Voelkel NF, Nicolls MR. Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circulation research* 2011; 109: 867-879.
175. Cohen-Kaminsky S, Hautefort A, Price L, Humbert M, Perros F. Inflammation in pulmonary hypertension: what we know and what we could logically and safely target first. *Drug discovery today* 2014; 19: 1251-1256.
176. Mizuno S, Farkas L, Al Hussein A, Farkas D, Gomez-Arroyo J, Kraskauskas D, Nicolls MR, Cool CD, Bogaard HJ, Voelkel NF. Severe pulmonary arterial hypertension induced by SU5416 and ovalbumin immunization. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012; 47: 679-687.
177. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circulation research* 2014; 115: 165-175.
178. Meloche J, Renard S, Provencher S, Bonnet S. Anti-inflammatory and immunosuppressive agents in PAH. *Handbook of experimental pharmacology* 2013; 218: 437-476.
179. Hu J, Xu Q, McTiernan C, Lai YC, Osei-Hwedieh D, Gladwin M. Novel Targets of Drug Treatment for Pulmonary Hypertension. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 2015; 15: 225-234.
180. Furuya Y, Satoh T, Kuwana M. Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *International journal of rheumatology* 2010; 2010: 720305.
181. Ferrante A, Ciccio F, Guggino G, Colomba D, Triolo G. Tocilizumab therapy for unresponsive pulmonary arterial hypertension in a patient with Takayasu arteritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 2016; 45: 251-252.
182. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, Funk GC, Hamilton G, Novotny C, Burian B, Block LH. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 2003; 111: 1339-1346.
183. Leuchte HH, Baezner C, Baumgartner RA, Bevec D, Bacher G, Neurohr C, Behr J. Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 2008; 32: 1289-1294.
184. Courboulin A, Ranchoux B, Cohen-Kaminsky S, Perros F, Bonnet S. MicroRNA networks in pulmonary arterial hypertension: share mechanisms with cancer? *Current opinion in oncology* 2016; 28: 72-82.
185. Caruso P, MacLean MR, Khanin R, McClure J, Soon E, Southgate M, MacDonald RA, Greig JA, Robertson KE, Masson R, Denby L, Dempsey Y, Long L, Morrell NW, Baker AH. Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of

- pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010; 30: 716-723.
186. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard MJ, Bonnet S. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *The Journal of experimental medicine* 2011; 208: 535-548.
 187. Kim J, Kang Y, Kojima Y, Lighthouse JK, Hu X, Aldred MA, McLean DL, Park H, Comhair SA, Greif DM, Erzurum SC, Chun HJ. An endothelial apelin-FGF link mediated by miR-424 and miR-503 is disrupted in pulmonary arterial hypertension. *Nature medicine* 2013; 19: 74-82.
 188. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
 189. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research* 2004; 95: 343-353.
 190. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases. *Cell transplantation* 2007; 16: 273-284.
 191. Xia L, Fu GS, Yang JX, Zhang FR, Wang XX. Endothelial progenitor cells may inhibit apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells: new insights into cell therapy for pulmonary arterial hypertension. *Cytotherapy* 2009; 11: 492-502.
 192. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH, Chen JZ. Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Pediatric transplantation* 2008; 12: 650-655.
 193. Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Zhu JH, Xie XD, Tao QM, Zhu JH, Chen JZ. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 49: 1566-1571.
 194. Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, Gunther S, Girerd B, Jais X, Algalarrondo V, Price LC, Savale L, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & therapeutics* 2014; 141: 172-191.
 195. Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* 2005; 112: 423-431.
 196. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Darteville P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *The Journal of clinical investigation* 2009; 119: 512-523.
 197. Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Darteville P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011; 45: 311-322.
 198. Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Herve P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008; 178: 81-88.
 199. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary

- hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of clinical investigation* 2005; 115: 2811-2821.
200. Zaiman AL, Podowski M, Medicherla S, Gordy K, Xu F, Zhen L, Shimoda LA, Neptune E, Higgins L, Murphy A, Chakravarty S, Protter A, Sehgal PB, Champion HC, Tudor RM. Role of the TGF-beta/Alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008; 177: 896-905.
201. Al-Husseini A, Kraskauskas D, Mezzaroma E, Nordio A, Farkas D, Drake JI, Abbate A, Felty Q, Voelkel NF. Vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling contributes to angioobliterative pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation* 2015; 5: 101-116.
202. Patel N, Moenkemeyer F, Germano S, Cheung MM. Plasma vascular endothelial growth factor A and placental growth factor: novel biomarkers of pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2015; 308: L378-383.
203. Liu Z, Zhang R, Yang Y, Wang J, He Z, Chen J. [Hepatocyte growth factor intervention on rats with pulmonary hypertension and effect of endothelial cell membrane microparticles]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases* 2014; 37: 433-436.
204. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F, Pascoe S. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010; 182: 1171-1177.
205. Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galie N, Gomez-Sanchez MA, Grimminger F, Grunig E, Hassoun PM, Morrell NW, Peacock AJ, Satoh T, Simonneau G, Tapson VF, Torres F, Lawrence D, Quinn DA, Ghofrani HA. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 2013; 127: 1128-1138.
206. Frost AE, Farber HW, Barst RJ, Miller DP, Elliott CG, McGoon MD. Demographics and outcomes of patients diagnosed with pulmonary hypertension with pulmonary capillary wedge pressures 16 to 18 mm Hg: insights from the REVEAL Registry. *Chest* 2013; 143: 185-195.
207. Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Barst RJ, Sugeng L, Coslet S, Perrino TJ, Bond L, Lacouture ME, Archer SL, Ratain MJ. A dosing/cross-development study of the multikinase inhibitor sorafenib in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010; 87: 303-310.
208. Atallah E, Kantarjian H, Cortes J. In reply to 'Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate'. *Nature medicine* 2007; 13: 14; author reply 15-16.
209. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature medicine* 2006; 12: 908-916.
210. Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of experimental zoology* 1951; 116: 321-361.
211. Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacology & therapeutics* 2008; 117: 52-76.
212. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *Journal of the neurological sciences* 1995; 130: 119-127.

213. Cattaneo A, Capsoni S, Paoletti F. Towards non invasive nerve growth factor therapies for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2008; 15: 255-283.
214. Tuszynski MH, Yang JH, Barba D, U HS, Bakay RA, Pay MM, Masliah E, Conner JM, Kobalka P, Roy S, Nagahara AH. Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease. *JAMA neurology* 2015; 72: 1139-1147.
215. Dechant G, Neumann H. Neurotrophins. *Advances in experimental medicine and biology* 2002; 513: 303-334.
216. Wiesmann C, de Vos AM. Nerve growth factor: structure and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2001; 58: 748-759.
217. McDonald NQ, Chao MV. Structural determinants of neurotrophin action. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270: 19669-19672.
218. Selby MJ, Edwards R, Sharp F, Rutter WJ. Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Molecular and cellular biology* 1987; 7: 3057-3064.
219. Edwards RH, Selby MJ, Rutter WJ. Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature* 1986; 319: 784-787.
220. Gadiant RA, Cron KC, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neuroscience letters* 1990; 117: 335-340.
221. Olgart C, Frossard N. Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids. *The European respiratory journal* 2001; 18: 115-121.
222. Freund V, Pons F, Joly V, Mathieu E, Martinet N, Frossard N. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *The European respiratory journal* 2002; 20: 458-463.
223. Pons F, Freund V, Kuissu H, Mathieu E, Olgart C, Frossard N. Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *European journal of pharmacology* 2001; 428: 365-369.
224. Khan N, Smith MT. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. *Molecules* 2015; 20: 10657-10688.
225. Fayard B, Loeffler S, Weis J, Vogelin E, Kruttgen A. The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. *Journal of neuroscience research* 2005; 80: 18-28.
226. Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, Mokhtarani M, Shelton DL, Smith MD, Brown MT. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *The New England journal of medicine* 2010; 363: 1521-1531.
227. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews Neuroscience* 2003; 4: 299-309.
228. Masoudi R, Ioannou MS, Coughlin MD, Pagadala P, Neet KE, Clewes O, Allen SJ, Dawbarn D, Fahnestock M. Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284: 18424-18433.
229. Ryden M, Ibanez CF. Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271: 5623-5627.
230. Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo JA, Zhao W, Presta LG. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273: 5829-5840.

231. Cabrera N, Diaz-Rodriguez E, Becker E, Martin-Zanca D, Pandiella A. TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *The Journal of cell biology* 1996; 132: 427-436.
232. Diaz-Rodriguez E, Cabrera N, Esparis-Ogando A, Montero JC, Pandiella A. Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *The European journal of neuroscience* 1999; 11: 1421-1430.
233. Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ, Lee VM. Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *The Journal of comparative neurology* 1995; 356: 387-397.
234. Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 10984-10988.
235. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, Garaci E. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 1996; 85: 345-356.
236. Aloe L, De Simone R. NGF primed spleen cells injected in brain of developing rats differentiate into mast cells. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 1989; 7: 565-573.
237. Nassenstein C, Braun A, Erpenbeck VJ, Lommatzsch M, Schmidt S, Krug N, Luttmann W, Renz H, Virchow JC, Jr. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *The Journal of experimental medicine* 2003; 198: 455-467.
238. Burgi B, Otten UH, Ochensberger B, Rihs S, Heese K, Ehrhard PB, Ibanez CF, Dahinden CA. Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *Journal of immunology* 1996; 157: 5582-5588.
239. Otten U, Scully JL, Ehrhard PB, Gadiant RA. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Progress in brain research* 1994; 103: 293-305.
240. Freund-Michel V, Muller, B. and Frossard, N. Expression and role of the TrkA receptor in pulmonary inflammatory diseases. *"Inflammatory diseases – A modern perspective"* 2011: pp. 75-100.
241. Jing S, Tapley P, Barbacid M. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 1992; 9: 1067-1079.
242. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annual review of neuroscience* 1996; 19: 463-489.
243. Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, Batzer A, Thomas S, Brugge J, Pelicci PG, Schlessinger J, Pawson T, et al. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 1992; 360: 689-692.
244. McCormick F. Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Molecular reproduction and development* 1995; 42: 500-506.
245. Fabian JR, Daar IO, Morrison DK. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Molecular and cellular biology* 1993; 13: 7170-7179.

246. Berninger B, Garcia DE, Inagaki N, Hahnel C, Lindholm D. BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport* 1993; 4: 1303-1306.
247. Kita Y, Kimura KD, Kobayashi M, Ihara S, Kaibuchi K, Kuroda S, Ui M, Iba H, Konishi H, Kikkawa U, Nagata S, Fukui Y. Microinjection of activated phosphatidylinositol-3 kinase induces process outgrowth in rat PC12 cells through the Rac-JNK signal transduction pathway. *Journal of cell science* 1998; 111 (Pt 7): 907-915.
248. Yasui H, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M. Differential responses to nerve growth factor and epidermal growth factor in neurite outgrowth of PC12 cells are determined by Rac1 activation systems. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 15298-15305.
249. Huebner K, Isobe M, Chao M, Bothwell M, Ross AH, Finan J, Hoxie JA, Sehgal A, Buck CR, Lanahan A, et al. The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83: 1403-1407.
250. Ernfors P, Hallbook F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H. Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron* 1988; 1: 983-996.
251. Williams KS, Killebrew DA, Clary GP, Seawell JA, Meeker RB. Differential regulation of macrophage phenotype by mature and pro-nerve growth factor. *Journal of neuroimmunology* 2015; 285: 76-93.
252. Wang S, Bray P, McCaffrey T, March K, Hempstead BL, Kraemer R. p75(NTR) mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *The American journal of pathology* 2000; 157: 1247-1258.
253. Xu M, Remillard CV, Sachs BD, Makino A, Platoshyn O, Yao W, Dillmann WH, Akassoglou K, Yuan JX. p75 neurotrophin receptor regulates agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2008; 295: H1529-1538.
254. Caporali A, Pani E, Horrevoets AJ, Kraenkel N, Oikawa A, Sala-Newby GB, Meloni M, Cristofaro B, Graiani G, Leroyer AS, Boulanger CM, Spinetti G, Yoon SO, Madeddu P, Emanuelli C. Neurotrophin p75 receptor (p75NTR) promotes endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: implications for diabetes-induced impaired neovascularization in ischemic limb muscles. *Circulation research* 2008; 103: e15-26.
255. Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 2002; 36: 375-386.
256. Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, Terzano C, Cardillo G, Amenta F, Bronzetti E. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004; 30: 12-19.
257. Ricci A, Greco S, Amenta F, Bronzetti E, Felici L, Rossodivita I, Sabbatini M, Mariotta S. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human pulmonary arteries. *Journal of vascular research* 2000; 37: 355-363.
258. Leon A, Burianni A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi-Montalcini R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 3739-3743.
259. Solomon A, Aloe L, Pe'er J, Frucht-Pery J, Bonini S, Bonini S, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1998; 102: 454-460.

260. Othumpangat S, Gibson LF, Samsell L, Piedimonte G. NGF is an essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. *PloS one* 2009; 4: e6444.
261. Caporali A, Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiological reviews* 2009; 89: 279-308.
262. Sherer TB, Neff PS, Hankins GR, Tuttle JB. Mechanisms of increased NGF production in vascular smooth muscle of the spontaneously hypertensive rat. *Experimental cell research* 1998; 241: 186-193.
263. Barnes PJ. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends in pharmacological sciences* 2010; 31: 335-343.
264. Path G, Braun A, Meents N, Kerzel S, Quarcoo D, Raap U, Hoyle GW, Nockher WA, Renz H. Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; 166: 818-826.
265. Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *European journal of immunology* 1998; 28: 3240-3251.
266. Kerzel S, Path G, Nockher WA, Quarcoo D, Raap U, Groneberg DA, Dinh QT, Fischer A, Braun A, Renz H. Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003; 28: 170-178.
267. Tokuoka S, Takahashi Y, Masuda T, Tanaka H, Furukawa S, Nagai H. Disruption of antigen-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in low affinity neurotrophin receptor p75 gene deficient mice. *British journal of pharmacology* 2001; 134: 1580-1586.
268. Nassenstein C, Dawbarn D, Pollock K, Allen SJ, Erpenbeck VJ, Spies E, Krug N, Braun A. Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006; 118: 597-605.
269. Frossard N, Naline E, Olgart Hoglund C, Georges O, Advenier C. Nerve growth factor is released by IL-1beta and induces hyperresponsiveness of the human isolated bronchus. *The European respiratory journal* 2005; 26: 15-20.
270. de Vries A, Engels F, Henricks PA, Leusink-Muis T, McGregor GP, Braun A, Groneberg DA, Dessing MC, Nijkamp FP, Fischer A. Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2006; 36: 1192-1200.
271. Freund-Michel V, Bertrand C, Frossard N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cellular signalling* 2006; 18: 621-627.
272. Freund-Michel V, Frossard N. Overexpression of functional TrkA receptors after internalisation in human airway smooth muscle cells. *Biochimica et biophysica acta* 2008; 1783: 1964-1971.
273. Zettler C, Head RJ, Rush RA. Chronic nerve growth factor treatment of normotensive rats. *Brain research* 1991; 538: 251-262.
274. Rahbek UL, Dissing S, Thomassen C, Hansen AJ, Tritsarlis K. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2005; 450: 355-361.
275. Kraemer R, Nguyen H, March KL, Hempstead B. NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999; 19: 1041-1050.

276. Iyer AS, Wells JM, Vishin S, Bhatt SP, Wille KM, Dransfield MT. CT scan-measured pulmonary artery to aorta ratio and echocardiography for detecting pulmonary hypertension in severe COPD. *Chest* 2014; 145: 824-832.
277. Clamon G, Herndon J, Cooper R, Chang AY, Rosenman J, Green MR. Radiosensitization with carboplatin for patients with unresectable stage III non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B and the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999; 17: 4-11.
278. Barbera JA, Blanco I. Management of Pulmonary Hypertension in Patients with Chronic Lung Disease. *Current hypertension reports* 2015; 17: 62.
279. Tanabe N, Taniguchi H, Tsujino I, Sakamaki F, Emoto N, Kimura H, Takamura K, Hanaoka M, Nishimura M, Tatsumi K, Group JRSLDPS. Multi-institutional retrospective cohort study of patients with severe pulmonary hypertension associated with respiratory diseases. *Respirology* 2015; 20: 805-812.
280. Vitulo P, Stanziola A, Confalonieri M, Libertucci D, Oggionni T, Rottoli P, Paciocco G, Tuzzolino F, Martino L, Beretta M, Callari A, Amaducci A, Badagliacca R, Poscia R, Meloni F, Refini RM, Geri P, Baldi S, Ghio S, D'Alto M, Argiento P, Sofia M, Guardamagna M, Pezzuto B, Vizza CD. Sildenafil in severe pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease: A randomized controlled multicenter clinical trial. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2016.
281. Ando K, Kuraishi H, Nagaoka T, Tsutsumi T, Hoshika Y, Kimura T, Ienaga H, Morio Y, Takahashi K. Potential Role of CT Metrics in Chronic Obstructive Pulmonary Disease with Pulmonary Hypertension. *Lung* 2015; 193: 911-918.
282. Barbera JA, Roger N, Roca J, Rovira I, Higenbottam TW, Rodriguez-Roisin R. Worsening of pulmonary gas exchange with nitric oxide inhalation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 1996; 347: 436-440.
283. Barbera JA, Riverola A, Roca J, Ramirez J, Wagner PD, Ros D, Wiggs BR, Rodriguez-Roisin R. Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994; 149: 423-429.
284. Voelkel NF, Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *The Journal of clinical investigation* 2000; 106: 733-738.
285. Chang DS, Hsu E, Hottinger DG, Cohen SP. Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence. *Journal of pain research* 2016; 9: 373-383.
286. Berg MM, Sternberg DW, Parada LF, Chao MV. K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267: 13-16.
287. Hirose M, Takatori M, Kuroda Y, Abe M, Murata E, Isada T, Ueda K, Shigemi K, Shibasaki M, Shimizu F, Hirata M, Fukazawa K, Sakaguchi M, Kageyama K, Tanaka Y. Effect of synthetic cell-penetrating peptides on TrkA activity in PC12 cells. *Journal of pharmacological sciences* 2008; 106: 107-113.
288. Hirose M, Kuroda Y, Murata E. NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain* 2016; 16: 175-182.
289. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2000; 44: 235-249.

290. Brown MT, Murphy FT, Radin DM, Davignon I, Smith MD, West CR. Tanezumab reduces osteoarthritic hip pain: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *Arthritis and rheumatism* 2013; 65: 1795-1803.
291. Tiseo PJ, Kivitz AJ, Ervin JE, Ren H, Mellis SJ. Fasinumab (REGN475), an antibody against nerve growth factor for the treatment of pain: results from a double-blind, placebo-controlled exploratory study in osteoarthritis of the knee. *Pain* 2014; 155: 1245-1252.
292. Schnitzer TJ, Ekman EF, Spierings EL, Greenberg HS, Smith MD, Brown MT, West CR, Verburg KM. Efficacy and safety of tanezumab monotherapy or combined with non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of knee or hip osteoarthritis pain. *Annals of the rheumatic diseases* 2015; 74: 1202-1211.
293. Tiseo PJ, Ren H, Mellis S. Fasinumab (REGN475), an antinerve growth factor monoclonal antibody, for the treatment of acute sciatic pain: results of a proof-of-concept study. *Journal of pain research* 2014; 7: 523-530.
294. Gimbel JS, Kivitz AJ, Bramson C, Nemeth MA, Keller DS, Brown MT, West CR, Verburg KM. Long-term safety and effectiveness of tanezumab as treatment for chronic low back pain. *Pain* 2014; 155: 1793-1801.
295. Mullard A. Drug developers reboot anti-NGF pain programmes. *Nature reviews Drug discovery* 2015; 14: 297-298.
296. Miller CG, Guermazi A, Roemer F. The current status of imaging in anti-NGF clinical trials. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2015; 23 Suppl 1: S3-7.
297. Coyle K, Coyle D, Blouin J, Lee K, Jabr MF, Tran K, Mielniczuk L, Swiston J, Innes M. Cost Effectiveness of First-Line Oral Therapies for Pulmonary Arterial Hypertension: A Modelling Study. *Pharmacoeconomics* 2016; 34: 509-520.
298. Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 2012; 40: 766-782.
299. Dagnell C, Kemi C, Klominek J, Eriksson P, Skold CM, Eklund A, Grunewald J, Olgart Hoglund C. Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2007; 150: 303-310.
300. Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Yoo DH, Park IC, Kim MS, Lee SH, Rhee CH, Hong SI. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 30485-30496.
301. Khan KM, Falcone DJ, Kraemer R. Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 2353-2359.
302. Yang YG, Tian WM, Zhang H, Li M, Shang YX. Nerve growth factor exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in a rat model of chronic asthma. *Experimental and therapeutic medicine* 2013; 6: 1251-1258.
303. Salvi SS. Alpha1-adrenergic hypothesis for pulmonary hypertension. *Chest* 1999; 115: 1708-1719.
304. Zhang Q, Tan Y. Nerve growth factor augments neuronal responsiveness to noradrenaline in cultured dorsal root ganglion neurons of rats. *Neuroscience* 2011; 193: 72-79.
305. Aubert L, Guilbert M, Corbet C, Genot E, Adriaenssens E, Chassat T, Bertucci F, Daubon T, Magne N, Le Bourhis X, Toillon RA. NGF-induced TrkA/CD44

- association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget* 2015; 6: 9807-9819.
306. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Advances in experimental medicine and biology* 2011; 704: 687-706.
307. Dahan D, Ducret T, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP, Esteve E. Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012; 303: L824-833.
308. Wang YX, Wang J, Wang C, Liu J, Shi LP, Xu M, Wang C. Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *The Journal of membrane biology* 2008; 223: 151-159.
309. Goldenberg NM, Wang L, Ranke H, Liedtke W, Tabuchi A, Kuebler WM. TRPV4 Is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Anesthesiology* 2015; 122: 1338-1348.
310. Girard BM, Merrill L, Malley S, Vizzard MA. Increased TRPV4 expression in urinary bladder and lumbosacral dorsal root ganglia in mice with chronic overexpression of NGF in urothelium. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2013; 51: 602-614.
311. Adcock JJ. TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2009; 22: 65-70.

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

Publications internationales

- **Florence Coste**, Gaël Dournes, Claire Dromer, Elodie Blanchard, Véronique Freund-Michel, Pierre-Olivier Girodet, Michel Montaudon, Fabien Baldacci, François Picard, Roger Marthan, Patrick Berger, and François Laurent. CT evaluation of small pulmonary vessels area in COPD patients with severe pulmonary hypertension. *Thorax* 2016 Apr 15. pii: thoraxjnl-2015-207696.
- Véronique Freund-Michel, Marcelina Cardoso Dos Santos, Christophe Guignabert, David Montani, Carole Phan, **Florence Coste**, Ly Tu, Mathilde Dubois, Barbara Girerd, Arnaud Courtois, Marc Humbert, Jean-Pierre Savineau, Roger Marthan, and Bernard Muller. Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015 Aug 1;192(3):342-55. (Editorial associé)
- Gaël Dournes, François Laurent, **Florence Coste**, Claire Dromer, Elodie Blanchard, François Picard, Fabien Baldacci, Michel Montaudon, Pierre-Olivier Girodet, Roger Marthan, and Patrick Berger. CT Measurement of Airway Remodeling and Emphysema in Advanced COPD: Correlation to Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015 Jan 1;191(1):63-70. (Editorial associé)

Article en cours de soumission :

Florence Coste, Christelle Guibert, Mathilde Dubois, Arnaud Courtois, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau, Bernard Muller, and Véronique Freund-Michel. Functional and histological characterization of a rodent model relevant to the severe human form of pulmonary arterial hypertension. (soumis à *Respiratory Research*)

Article en cours de rédaction :

Florence Coste, Christelle Guibert, Mathilde Dubois, Arnaud Courtois, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau, Bernard Muller, and Véronique Freund-Michel. Involvement of NGF and its receptors in experimental severe pulmonary arterial hypertension.

Travaux :

- M. Douard, **F. Coste**, M. Dubois, I. Baudrimont, R. Marthan, J.P. Savineau, C. Guibert, B. Muller, V. Freund-Michel. Mécanismes d'augmentation de la sécrétion du facteur de croissance des nerfs NGF dans l'hypertension pulmonaire : rôle du facteur de croissance transformant TGF- β . Résumé soumis pour les 12èmes journées de Recherche Respiratoire (J2R), Nice Octobre 2016, France.
- **F. Coste**, G. Dournes, C. Dromer, F. Baldacci, F. Picard, M. Montaudon, R. Marthan, P. Berger, F. Laurent. Computed tomography (CT) evaluation of small pulmonary vessels area in COPD patients with severe pulmonary hypertension. Journée scientifique de TRAIL 2016, Bordeaux, France. (communication affichée)
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, C. Guibert, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller, V. Freund-Michel. Involvement of NGF and its receptors in experimental severe pulmonary hypertension. Journée de l'école doctorale, 2016, Arcachon, France. (communication affichée)
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, C. Guibert, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller, V. Freund-Michel. Role of the TrkA receptor in experimental severe pulmonary hypertension. Annual congress of ERS, september 2015, Amsterdam. (communication affichée) *European Respiratory Journal* 2015 ; 46 (Suppl 59) : PA4915.
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, C. Guibert, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller, V. Freund-Michel. Rôle du facteur de croissance de nerfs (NGF) et de ses récepteurs dans l'hypertension pulmonaire sévère. Lungstorming, juin 2015, Paris. (communication orale)
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, C. Guibert, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller, V. Freund-Michel. Reversal of experimental severe pulmonary hypertension by TrkA inhibition. Annual congress of GRRC, april 2015, Toulouse. (communication affichée) *Archives of Cardiovascular Diseases* 2015 ; PC15-0114.
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, C. Guibert, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller, V. Freund-Michel. Involvement of NGF in experimental severe pulmonary hypertension. French-German lung retreat, march 2015, Tegernsee, Germany. (communication orale)

- G. Dournes, **F. Coste**, C. Dromer, O. Corneloup, M. Montaudon, P. Berger, F. Laurent. Evaluation des altérations bronchiques et vasculaires par TDM chez les patients BPCO compliqués d'hypertension Pulmonaire sévère. Journée Française de radiologie, Paris October 2014, France. (communication orale assurée par mes soins)
- G. Dournes, F. Laurent, **F. Coste**, C. Dromer, E. Blanchard, F. Picard, F. Baldacci, M. Montaudon, P.O. Girodet, R. Marthan, and P. Berger. CT Measurement of Airway Remodeling and Emphysema in Advanced COPD: Correlation to Pulmonary Hypertension. 10^{ème} journées de Recherche Respiratoire (J2R), Bordeaux 2014, France. *Revue des Maladies Respiratoires*, Actualités 2014 ; 9 : 31. (Communication affichée)
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, C. Guibert, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller, V. Freund-Michel. Reversal of experimental severe pulmonary hypertension by NGF inhibition. 10^{èmes} journées de Recherche Respiratoire (J2R), Bordeaux 2014, France. *Revue des Maladies Respiratoires*, Actualités 2014 ; 3 : 32 (Communication affichée)
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, C. Guibert, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller, V. Freund-Michel. Expression and role of the nerve growth factor NGF in severe pulmonary hypertension. Annual congress of ERS 2014, Munich, Germany. *ERJ* September 1, 2014 vol. 44 no. Suppl 58 P2369 (Communication affichée).
- **F. Coste**, G. Dournes, C. Dromer, F. Baldacci, F. Picard, M. Montaudon, R. Marthan, P. Berger, F. Laurent. Measurement of small pulmonary vessels by using computed tomography (CT) in COPD patients with severe pulmonary hypertension. Annual congress of ERS 2014, Munich, Germany. *ERJ* September 1, 2014 vol. 44 no. Suppl 58 P 2333 (Communication affichée).
- G. Dournes, **F. Coste**, C. Dromer, F. Baldacci, M. Montaudon, F. Laurent. CT measurement of small vessels as a tool to phenotype COPD subjects with severe pulmonary hypertension. Congrès annuel de l'European society of thoracic imaging (ESTI), Amsterdam, juin 2014, Pays-Bas. (Communication orale).
- V. Freund-Michel, **F. Coste**, M. Dubois, A. Courtois, R. Marthan, J.P. Savineau, B. Muller. NGF contributes to medial and intimal remodelling of pulmonary arteries in pulmonary hypertension: receptors and signaling pathways involved in smooth muscle and endothelial cell proliferation. Annual congress of GRRC, april 2014, Strasbourg. (communication affichée) *Archives of Cardiovascular Diseases* 2014 ; 6 (Suppl 1), 76, Abstract 0027.

- **F. Coste**, G. Dournes, C. Dromer, O. Corneloup, F. Baldacci, F. Picard, M. Montaudon, R. Marthan, P. Berger, F. Laurent. Evaluation des particularités cliniques et tomodensitométriques des patients BPCO compliqués d'hypertension pulmonaire sévère. SFRIMRA (société française de radiologie et d'imagerie médicale), Bordeaux, mars 2014, France. (**Prix** de communication orale)
- **F. Coste**, C. Toussaint, M. Dubois, A. Courtois, J.P. Savineau, R. Marthan, B. Muller, V. Freund-Michel. Role of the nerve growth factor NGF in severe pulmonary hypertension. 9^{èmes} journées de Recherche Respiratoire (J2R), Montpellier, octobre 2013, France. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2014; 31(7):660. Publication en ligne : 2014 (Communication affichée). Présenté en communication affichée lors de la journée SFR transbiomed 2013. Présenté en communication affichée lors de l'assemblée générale des internes en pharmacie, mars 2014, Bordeaux, France. Présenté en communication affichée lors de la Journée SFR TECSAN Juin 2014 Bordeaux