



HAL
open science

Potentiel thérapeutique des progeniteurs endothéliaux dans le traitement de la défaillance ventriculaire droite secondaire à l'hypertension pulmonaire

Fanny Loisel

► **To cite this version:**

Fanny Loisel. Potentiel thérapeutique des progeniteurs endothéliaux dans le traitement de la défaillance ventriculaire droite secondaire à l'hypertension pulmonaire. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS023 . tel-02388504

HAL Id: tel-02388504

<https://theses.hal.science/tel-02388504>

Submitted on 2 Dec 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.

Potentiel thérapeutique des progéniteurs endothéliaux dans le traitement de la défaillance ventriculaire droite secondaire à l'hypertension artérielle pulmonaire

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat: Physiopathologie moléculaire et cellulaire

Thèse présentée et soutenue à l'Hôpital Brousse, Villejuif,
le 17 janvier 2019, par

Fanny LOISEL

Composition du Jury :

Pr Philippe Menasché PU-PH, INSERM U970, Hôpital Européen Georges Pompidou	Président du jury
Dr Valérie Vanneaux DR, INSERM U1160, Hôpital Saint Louis	Rapporteur
Dr Didier Letourneur DR, INSERM U1148, Bichat	Rapporteur
Pr Annelise Bennaceur-Griscelli PU-PH, INSERM U935, Paris-Sud	Examineur
Pr Abdul Barakat PR, CNRS U7646, Ecole Polytechnique	Examineur
Dr Georges Uzan DR, INSERM U1197, Hôpital Paul Brousse	Co-Directeur de thèse

Membres invités :

Pr Olaf Mercier PU-PH, INSERM U999, Paris-Sud	Directeur de thèse
Pr Elie Fadel PU-PH, INSERM U999, Paris-Sud	

Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu le Pr Olaf Mercier. Merci pour votre énergie, votre motivation et vos idées, qui sont toujours développées dans l'objectif d'être d'appliquées en clinique. Merci de m'avoir permis de partir en congrès, de m'avoir incitée à rédiger une revue, de m'avoir encouragée à mener des collaborations, d'avoir pris le temps de discuter des résultats et surtout de m'avoir fait confiance pour mener ce projet. Enfin, merci de m'avoir fourni tous les moyens nécessaires pour réaliser toutes ces études. Il faut pouvoir vous suivre, mais j'ai beaucoup appris à vos côtés.

Je remercie mon co-directeur de thèse, le Dr Georges Uzan, de m'avoir accueilli dans son laboratoire dès le stage de master 1 et de m'avoir à nouveau accordé sa confiance pour la thèse. Merci de m'avoir proposé un sujet de thérapie cellulaire, une thématique qui me tenait à cœur, et de m'avoir mise en contact avec le Pr Olaf Mercier afin de mener à bien ce projet de thèse. Merci pour l'autonomie accordée au cours de cette thèse et les contacts que vous m'avez fourni.

Je souhaite remercier les rapporteurs de cette thèse. Dr Didier Letourneur, merci d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et ce depuis la mi-thèse. Je souhaite aussi vous remercier vivement pour votre aide, votre participation, vos conseils et votre disponibilité pour le projet « patch ». J'ai rarement vu un directeur de recherche se rendant encore disponible pour réaliser de nouvelles expériences. Dr Valérie Vanneaux, c'est pour moi un honneur de pouvoir vous compter en tant que rapporteur de ma thèse. Je vous remercie du temps et de l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Je remercie vivement le Pr Philippe Menasché d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Vous et vos travaux dans le domaine de la thérapie cellulaire sont reconnus mondialement et c'est un grand honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'être le président du jury de ma thèse.

Je remercie le Pr Abdul Barakat, pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour votre accueil chaleureux dans votre laboratoire lors des expériences menées dans le cadre du RHU.

J'associe à ces remerciements le Pr Annelise Bennaceur, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Enfin, je souhaite remercier le Pr Elie Fadel de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Vos conseils à des moments opportuns de ma thèse étaient toujours pertinents.

Ayant effectué ma thèse sur 2 sites, il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme. J'aimerais tout de même remercier certaines personnes en particulier.

A l'hôpital Marie Lannelongue :

J'adresse de sincères et chaleureux remerciements au Dr Julien Guihaire. Ta rencontre a été déterminante pour cette thèse. Sans ta patience et ton aide il n'y aurait pas eu de manip, pas d'article et donc pas de thèse. Merci pour l'intérêt et tout le temps que tu as accordé à ce projet. C'est toujours agréable de travailler avec toi car tu es passionné et tu aimes partager et enseigner. Enfin, merci pour ton soutien et tes encouragements au cours de cette thèse qui m'ont permis d'avancer. Dommage qu'il y ait trop peu de personne comme toi dans le monde de la recherche.

Un grand merci au Dr David Boulate. Merci énormément d'avoir participé à toutes ces opérations et ces acquisitions de PVL, je serais presque une experte maintenant grâce à toi... Pointilleux, tu fais tout à fond, et tu prends les choses à cœur. Il est parfois un peu dur de te suivre car tu as 10 idées par minute, mais c'est toujours un plaisir de travailler avec toi. Merci pour la relecture des PVL, chose pas toujours passionnante mais tu as pris le temps.

Je remercie le Dr Bastien Provost d'avoir initié cette étude qui m'a permis de mener un projet de thèse qui me tenait à cœur.

Merci à Benoit Decante de m'avoir accueillie au laboratoire et de m'avoir aidé à organiser les manip cochon.

Merci à Pierre Molinié pour tes conseils, plutôt d'ordre professionnel que scientifique, mais toujours très utiles.

Je souhaite aussi remercier le service d'anatomopathologie : Caroline (merci pour ta bonne humeur !), Peter et Maria.

Merci à l'équipe du Laboratoire de Recherche Chirurgicale : Frédéric, Bruno merci pour votre bonne humeur et votre aide avec les porcs. Anaëlle et Anselme merci d'avoir pris soin des animaux.

Et bien sûr Lilia (ton sourire et ta gentillesse vont me manquer...), Florence, Catherine, Mélanie, Grégoire, Véronique, Yvonne, merci d'avoir répondu à toutes mes questions. Jennifer, un grand MERCI pour tout, l'aide pour les manip et tout le reste... le labo n'est plus le même depuis que tu es partie.

A l'hôpital Paul Brousse :

Merci à « l'after team » pour nos soirées décompression.. ! Anne-Charlotte, merci pour tes conseils pour les manip et pour tout ce temps passé à discuter de tout et rien. Guillaume, merci pour ton aide et ta bonne humeur. Alejandra, merci pour ta bonne humeur et bon courage pour la suite.. ! Ségolène, merci pour ton aide et tes conseils. Richard, merci pour tes conseils pour les manip. Vincent, merci pour ta patience et ton aide quand j'avais des problèmes informatiques et autres ! Laura, Olivier, Mélanie, Cécile, Axel, Julien, Etienne merci pour tous les bons moments passés ensemble, j'espère qu'il y en aura plein d'autres !

Nassim, sans toi je ne serai pas arrivée dans ce labo pour y faire ma thèse. Merci pour tes blagues pourries et le fait que tu ne te prennes pas la tête et merci pour ton aide pour la culture !

Merci à Philippe pour ses conseils sur les milieux conditionnés, à Sabrina pour sa gentillesse et sa bonne humeur et à Sylvie.

Un grand merci à Hind, Maïté et Estelle pour vos conseils et discussions sur ma thèse.

Merci aussi aux personnes « du côté Caro » pour leur gentillesse, Marie-Caroline, Bernadette, Denis, Adrienne, Fred, Laura.

Merci aux « anciennes », ABCell-Bio, Laura et Sandra, pour avoir partagé votre bureau, l'ambiance était plus fun à l'époque ! Mélanie pour tes conseils, et les pauses chocolat au début de la thèse.. !

Enfin, je remercie ma famille et mes amis de m'avoir soutenue toutes ces années.

A ma famille, merci à mes parents et même si vous n'avez pas toujours tout compris, merci de m'avoir portée jusque-là et de m'avoir toujours encouragée à aller plus loin. Merci à François et Jérôme pour leurs conseils avisés pour la suite. Anna, Margaux, Agathe...

A ceux qui sont partis trop tôt et qui, j'en suis sûre, sont très fiers de moi. Vous manquez.

A mes amis, Ophélie, Chloé, Laura, Margaux, Alisson, Simon, Charles, Mathieu, qui m'ont permis de décompresser, de relativiser et de me rebooster tout au long de cette thèse ! Merci d'avoir essayé de comprendre ce que je faisais et de m'avoir soutenue ! Spéciale dédicace à Laura pour toutes nos soirées débriefs qui m'ont permis de faire face et de tenir le coup !

Merci aussi aux copains de Roscoff où tout a commencé : Aurélien, Alex, Gilles, Mathilde, Brice, Ula, Clio, Tanguy...

Le meilleur pour la fin, merci à toi de me suivre et me supporter depuis toutes ces années. Merci pour ton soutien inconditionnel, sans tes conseils (scientifiques et autres) je ne serais pas arrivée au bout. J'espère que nous continuerons comme ça encore de nombreuses années, on forme une bonne équipe !

Table des matières

Table des matières.....	7
Liste des abréviations	11
Liste des figures	13
Liste des tableaux	17
Avant-propos	19
Introduction	21
Chapitre I : Le système vasculaire	23
I. Système cardiovasculaire	23
II. Le cœur	25
1. Chambres cardiaques	25
2. Circulation coronaire	26
3. Cycle cardiaque.....	27
4. Paroi cardiaque	28
5. Composition cellulaire du cœur	28
Chapitre II : L'hypertension pulmonaire	31
I. L'hypertension pulmonaire.....	31
1. Définition.....	31
2. Classification	31
3. Symptômes.....	35
4. Diagnostic.....	35
II. Détail de l'Hypertension Pulmonaire Post-Embolique (HPPE)	37
1. Définition et épidémiologie	37
2. Signes cliniques et diagnostic	40
a. Signes cliniques.....	40
b. Diagnostic (Figure 13)	41
3. Traitements.....	43
a. Endartériectomie.....	43
b. Angioplastie pulmonaire à ballonnet	45
c. Traitements médicamenteux	46
d. Transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire	49
Chapitre III : Les modèles animaux pour l'étude de l'HTP	51
1. Modèles d'HTP	51
a. Monocrotaline	51

b.	Hypoxie chronique	52
c.	Cerclage du tronc de l'artère pulmonaire	53
d.	Modélisation chirurgicale	53
e.	Autres modèles	53
2.	Modèle porcin d'HPPE utilisé dans l'étude	55
Chapitre IV : Zoom sur le ventricule droit dans l'HTP		59
I.	Généralités sur l'insuffisance cardiaque droite en HTP	59
1.	Particularités et anatomie du ventricule droit	59
a.	Origine embryonnaire	59
b.	Morphologie	60
c.	Fonction et caractéristiques du VD	61
2.	Le ventricule droit en HTP	62
a.	Le ventricule droit, un point clé de la survie des patients HTP	62
b.	Détail du diagnostic de l'insuffisance cardiaque droite en HTP	63
c.	Deux états du VD en HTP : adapté et désadapté	65
II.	Détail des modifications affectant le ventricule droit en HTP	69
1.	Ischémie du ventricule droit	69
2.	Métabolisme du ventricule droit	72
3.	Activation sympathique du ventricule droit	74
4.	Fibrose du ventricule droit	76
5.	Inflammation du ventricule droit	78
III.	Traitements existants pour le VD en HTP	79
1.	Stratégies thérapeutiques ciblant la pression exercée sur la paroi du VD	80
a.	Atrioseptostomie	80
b.	Diurétiques	81
c.	Dispositif d'assistance ventriculaire droite	81
2.	Stratégies thérapeutiques ciblant les conséquences de la pression exercée sur la paroi du VD	82
a.	Resynchronisation cardiaque	82
b.	Soutien de l'apport en oxygène du VD	82
c.	Modulation neuro-hormonale	84
Chapitre V – Thérapie cellulaire ciblant le ventricule droit en HTAP		87
I.	Voies d'administration	87
1.	Intracoronaire	88
2.	Intracardiaque	89
3.	Par biomatériaux	91

II. Thérapie cellulaire pour le VD	95
1. Cellules souches mononucléées	96
2. Progéniteurs endothéliaux circulants.....	97
3. Cellules stromales mésenchymateuses	99
4. Cellules progénitrices cardiaques (CPC).....	101
5. Cellules souches dérivées du tissu adipeux.....	102
III. Quelle est la thérapie cellulaire idéale pour cibler le VD en HTP ?	103
1. Administration autologue ou allogénique ?.....	103
2. Quel timing d'administration ?.....	104
3. Quelle voie d'administration ?	104
4. Quelles cellules ?	104
5. Quel dosage ?	105
Chapitre VI – Les progéniteurs endothéliaux circulants	107
I. Les progéniteurs endothéliaux circulants	107
1. Première découverte	107
2. Différents types de PEC.....	108
3. Origine des PEC.....	110
4. Angiogenèse et réparation des tissus vasculaires lésés.....	111
II. Endothelial Colony Forming Cells	114
1. Caractéristiques phénotypiques.....	114
2. Caractéristiques fonctionnelles	114
3. Potentiel thérapeutique des ECFC pour les pathologies cardiaques.....	116
a. Administration de cellules.....	116
b. Administration de milieu conditionné.....	117
c. Administration via biomatériaux	119
Objectif	121
Résultats	125
Article n°1 : L'administration autologue de progéniteurs endothéliaux circulants améliore la fonction ventriculaire droite dans un modèle d'hypertension pulmonaire post embolique. ..	127
Culture <i>in vitro</i> : cardiomyocytes et milieu conditionné d'ECFC	149
Article n° 2 : Administration intracardiaque de progéniteurs endothéliaux dans un modèle porcin d'HPPE	157
Administration de progéniteurs endothéliaux circulants par patch.....	181
Discussion	191

I. Utiliser un modèle porcin présentant une dysfonction cardiaque droite avec diminution de la densité capillaire.....	192
II. Etudier l'effet d'un autre timing d'administration des cellules	194
III. Etudier plus en détail la voie d'administrations par patch pour améliorer la rétention cellulaire	195
IV. Utiliser d'autres méthodes pour suivre le devenir des ECFC après administration	196
V. Amélioration de la thérapie cellulaire <i>per se</i>	198
VI. Poursuivre la culture <i>in vitro</i> cardiomyocytes / ECFC.....	199
Conclusion et Perspectives.....	203
Annexes.....	209
Annexe 1 : Revue « Stem cell therapy targeting the right ventricle in pulmonary arterial hypertension : is it a potential avenue of therapy? » Loisel et al.	211
Annexe 2 : Poster présenté lors du congrès « 3rd European Spring School on Venous Thromboembolism » 2017	229
Annexe 3 : Poster présenté lors du congrès « International Vascular Biology Meeting » 2018 231	
Annexe 4 : « Article Soft thermoplastic elastomer for easy and rapid spin-coating fabrication of microfluidic devices with high hydrophilization and bonding performances » 3ème auteur, dans le cadre de la participation au RHU-BioArt Lung 2020.....	233
Références.....	241

Liste des abréviations

ATP : Adénosine Triphosphate
BNP : Brain Natriuretic Peptide
CSE : Cellules Souches Embryonnaires
CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuse
CSTA : Cellules Souches Tissue Adipeux
ECFC : Endothelial Colony Forming Cells
ET : Endothéline
FDG : fluorodésoxyglucose
FDA : Food and Drug Administration
GMP : guanosine monophosphate cyclique
GC : guanylate cyclases
HC : hypoxie chronique
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HLA : Human Leukocyte Antigen
HPP : High Proliferative Potential
HPPE : Hypertension Pulmonaire Post Embolique
HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire
HTP : Hypertension Pulmonaire
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LPP : Low Proliferative Potential
MCT : monocrotaline
miR : micro ARN
NO : oxyde nitrique
OD : Oreillette Droite
OG : Oreillette Gauche
PAP : Pression Artérielle Pulmonaire
PAPm : Pression Artérielle Pulmonaire moyenne
PDH : pyruvate dehydrogenase
PDK : kinase pyruvate dehydrogenase

PDE : phosphodiesterase

RPT : Résistance Pulmonaire Totale

RVP : Résistance Vasculaire Pulmonaire

SCO : Sang de Cordon Ombilical

Sdf1 : Stromal Cell-Derived Factor 1

VD : Ventricule Droit

VE : Vésicule Extracellulaire

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VG : Ventricule Gauche

WHO : World Health Organization

Liste des figures

Figure 1 : Système cardiovasculaire avec représentation des circulations pulmonaires et systémiques.

Figure 2 : Echanges gazeux au sein des poumons.

Figure 3 : Schéma détaillé du cœur.

Figure 4 : Circulation coronaire.

Figure 5 : Déroulement du cycle cardiaque.

Figure 6 : Schéma représentant le système cardiopulmonaire sain et dans le cas de l'HTP.

Figure 7 : Classification détaillée des HTP selon le symposium de Nice 2013.

Figure 8 : Description des HTP pré et post capillaires.

Figure 9 : Modifications pulmonaires dans l'HTAP.

Figure 10 : Algorithme de diagnostic de l'HTP.

Figure 11 : Schéma de la présence d'un matériel thromboembolique dans l'artère pulmonaire, caractéristique de l'HPPE.

Figure 12 : Schéma du concept pathophysiologique de l'HPPE.

Figure 13 : Examens à effectuer pour établir le diagnostic d'une HPPE.

Figure 14 : Résultats d'examens établissant le diagnostic d'une HPPE.

Figure 15 : Algorithme de traitement utilisé pour l'HPPE.

Figure 16 : Schéma de la procédure d'endartériectomie pulmonaire.

Figure 17 : Matériel thromboembolique retiré de l'arbre vasculaire pulmonaire lors de l'endartériectomie.

Figure 18 : Schéma du déroulement d'une angioplastie pulmonaire à ballonnet.

Figure 19 : Evolution du nombre de transplantations pulmonaires et d'endartériectomies entre 1994 et 2013.

Figure 20 : Développement d'une HTP suite à l'injection de monocrotaline.

Figure 21 : Plan expérimental de l'induction de l'HPPE chez le porc.

Figure 22 : Caractéristiques du modèle porcin d'HPPE.

Figure 23 : Développement embryonnaire du cœur.

Figure 24 : Morphologie du VD et VG.

Figure 25 : Système cardio-pulmonaire qui image le rôle du VD.

Figure 26 : Etude de la survie des patients atteints d'HTP avec ou sans insuffisance cardiaque droite associée.

Figure 27 : Cercle vicieux dans lequel est pris le VD en HTP.

Figure 28 : Transition de l'état adapté vers l'état désadapté du VD en HTP.

Figure 29 : Imagerie IRM du VD, chez un contrôle sain et un patient atteint d'HTAP, au repos et suite à un stress induit par l'adénosine.

Figure 30 : Densité capillaire du VD dans les modèles murins d'HTP.

Figure 31 : Densité capillaire du VD à l'état adapté et désadapté.

Figure 32 : Densité capillaire du VD de patients.

Figure 33 : Imagerie de l'absorption par le cœur du ^{18}F FDG chez un patient sain et un patient atteint d'HTAP.

Figure 34 : Résumé des différents types de fibrose cardiaque.

Figure 35 : IRM cardiaque montrant la rétention de gadolinium (cercles rouges) aux points d'insertion du VD sur le septum interventriculaire.

Figure 36 : Schéma récapitulatif des 3 principales voies d'administration de cellules dans le VD défaillant.

Figure 37 : Différents types de supports pour l'administration de cellules en thérapie cellulaire.

Figure 38 : Processus d'implantation du patch de fibrine contenant des progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires.

Figure 39 : Méthode d'isolement des cellules mononuclées.

Figure 40 : Méthodes d'isolement des PEC.

Figure 41 : Synergie des cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques et des ECFC pour la réparation tissulaire suite à une lésion vasculaire.

Figure 42 : Synergie des cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques et des ECFC pour l'angiogenèse.

Figure 43 : Tests classiques pour la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des ECFC.

Figure 44 : Schéma représentant la sécrétion de microvésicules et d'exosomes par une cellule.

Figure 45 : Marquage immunofluorescent des cardiomyocytes dérivés d'iPS.

Figure 46 : Expression du BNP en réponse à différentes concentrations d'endothéline-1.

Figure 47 : Détail de la production des milieux conditionnés.

Figure 48 : Schéma expérimental de l'application de milieu conditionné d'ECFC sur des cardiomyocytes hypertrophiés.

Figure 49 : Expression du proBNP par les cardiomyocytes en présence de milieu conditionné d'ECFC.

Figure 50 : Mesure de la surface des cardiomyocytes.

Figure 51 : Ensemencement et viabilité des ECFC dans le patch.

Figure 52 : Pose d'un patch ensemencé avec des ECFC sur le VD.

Figure 53 : Nouvelle méthode d'ensemencement des ECFC dans le patch et survie des cellules.

Figure 54 : Schéma représentant la disposition des patches sur le VD d'un porc modèle pour l'HTP.

Figure 55 : Pose d'un patch ensemencé avec des ECFC sur le VD d'un porc pendant 7 jours.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des facteurs de risque impliqués dans le développement de l'HPPE.

Tableau 2 : Récapitulatif des principaux modèles d'HTP utilisés.

Tableau 3 : Résumé des différentes caractéristiques des états adapté et désadapté du VD en HTP.

Tableau 4 : Bilan des caractéristiques des PEC précoces et tardifs.

Avant-propos

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une pathologie rare et grave caractérisée par une obstruction du lit vasculaire pulmonaire. En réponse à cette obstruction, les résistances pulmonaires augmentent ainsi que la post-charge du ventricule droit (VD). Par conséquent, une dysfonction cardiaque droite se développe. Dans un premier temps, le VD se remodèle de façon adaptée, puis, avec la progression de la pathologie, le VD passe à un état désadapté. L'apparition d'une ischémie du VD marque la transition vers cet état. Dans cette pathologie, la fonction du VD conditionne la survie des patients, c'est pourquoi nous avons choisi de cibler cet organe.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les effets sur le VD d'une thérapie cellulaire à base de progéniteurs endothéliaux, les PEC, qui sont des cellules capables de favoriser l'angiogenèse en participant à la formation de nouveaux vaisseaux de manière directe et indirecte via la sécrétion de facteurs paracrines. Pour ce faire, un modèle porcin d'HTP développé au sein du laboratoire a été utilisé. Il s'agit plus précisément d'un modèle d'hypertension pulmonaire post-embolique (HPPE), qui est une sous-catégorie d'HTP. La thérapie cellulaire a été appliquée par différentes voies d'administration et les effets sur l'hémodynamique cardiaque et sur le remodelage du VD ont été évalués.

Introduction

Chapitre I : Le système vasculaire

I. Système cardiovasculaire

L'appareil cardiovasculaire est un système circulatoire en circuit fermé, caractérisé par la circulation systémique et la circulation pulmonaire. La **circulation systémique** (Figure 1) amène le sang oxygéné vers les organes et ramène le sang désoxygéné vers le cœur. Le sang oxygéné part du ventricule gauche (VG), ressort du cœur par l'aorte qui se divise en artères, artérioles et capillaires irriguant les tissus des différents organes. La circulation systémique permet ainsi d'apporter aux cellules de chaque organe l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur fonctionnement. Le dioxyde de carbone et les déchets sont récupérés et évacués des tissus par les veinules, veines et veine cave qui débouche dans l'oreillette droite (OD). Le sang désoxygéné repart ensuite via le ventricule droit (VD) vers les poumons. La circulation systémique est constituée de réseaux en parallèle, chacun amenant le sang vers un organe différent et ayant sa propre résistance artérielle.

La **circulation pulmonaire** forme un circuit fermé entre le cœur et les poumons (Figure 1). Sa fonction est d'amener le sang désoxygéné aux poumons afin qu'il soit ré-oxygéné. Le VD pompe le sang désoxygéné vers les poumons via l'artère pulmonaire, divisée en 2 branches pour déboucher dans les poumons droit et gauche. A l'entrée des poumons, les artères se subdivisent en artérioles puis capillaires. C'est au niveau des alvéoles que le sang présent dans les capillaires récupère l'oxygène et relargue le dioxyde de carbone, évacué avec l'air par les bronches puis la trachée (Figure 2). Le sang oxygéné repart par les veinules qui se rassemblent en veine pulmonaire débouchant dans l'oreillette gauche (OG). Le sang passe ensuite dans le VG pour poursuivre son trajet dans la circulation systémique.

La paroi des artères pulmonaires est constituée de différentes épaisseurs : la plus externe se nomme l'**adventice** ; l'intermédiaire, la **media** ; et celle en contact avec la lumière est l'**intima**.

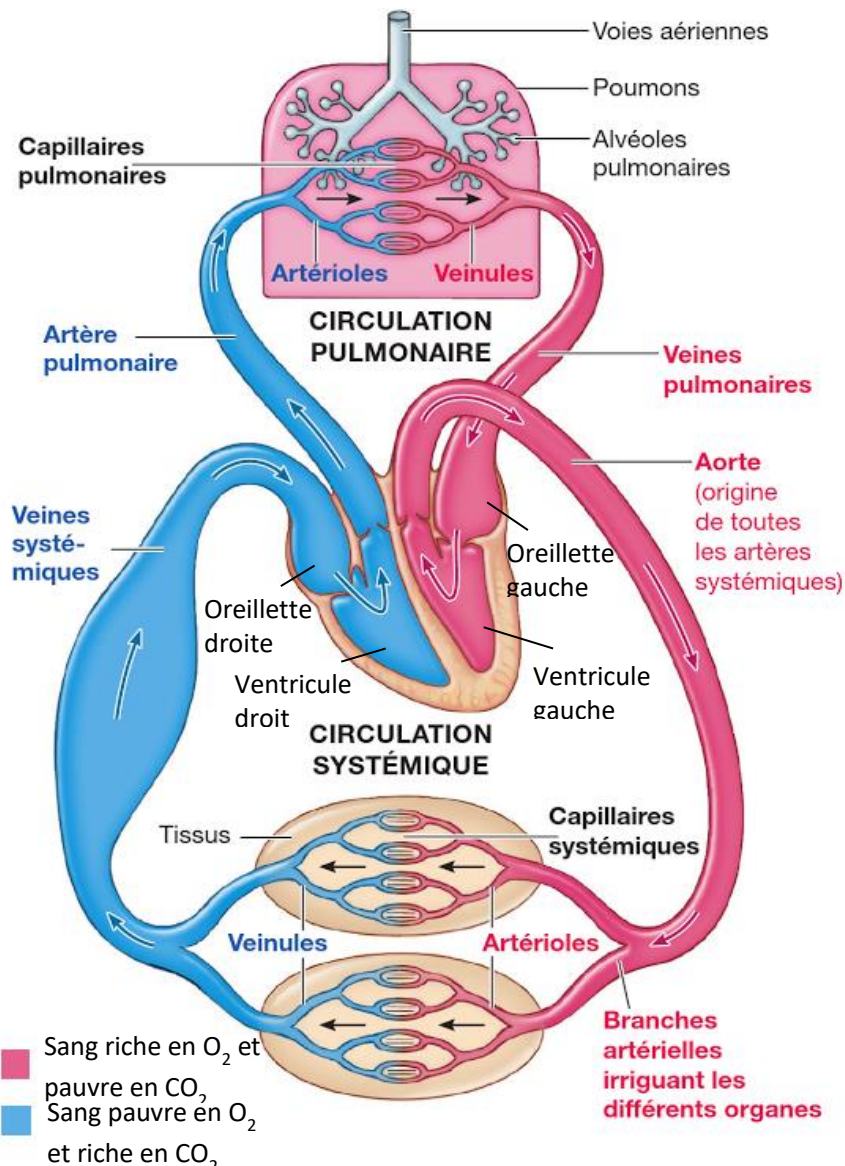


Figure 1 – Système cardiovasculaire avec représentation des circulations pulmonaires et systémiques. Adaptée de « Physiologie humaine » (Sherwood, Molotchnikoff, et Lockhart 2006).

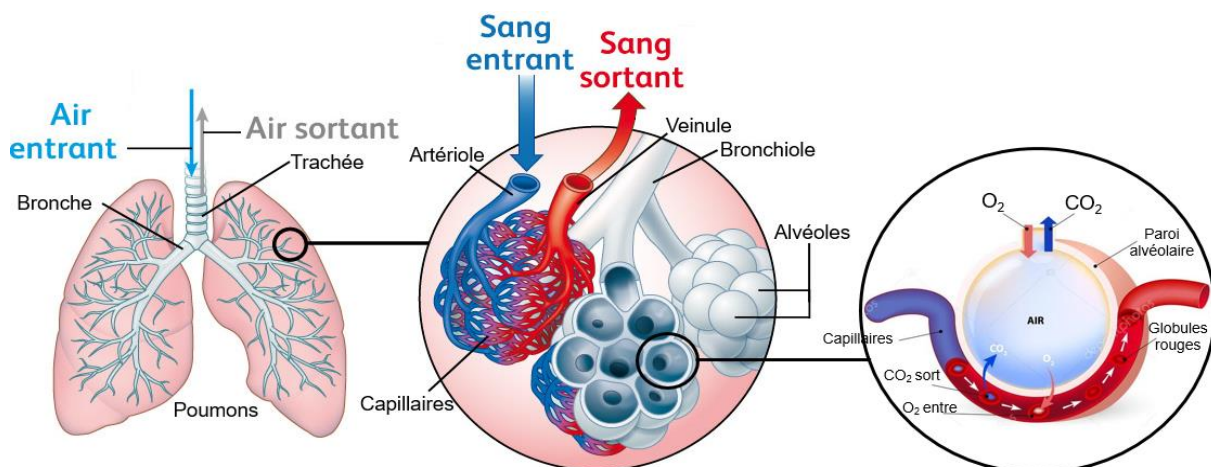


Figure 2 : Echanges gazeux au sein des poumons. Adaptée de <http://www.illustration-medicale.org> et de fr.depositphotos.com (edesignua).

II. Le cœur

Bien que l'hypertension pulmonaire (HTP) affecte les poumons et le cœur, le cœur constitue le principal organe étudié au cours de ce travail de thèse. Par conséquent, ses structure et fonction seront décrites brièvement dans ce manuscrit.

1. Chambres cardiaques

Le cœur est le muscle qui pompe le sang vers les organes par des contractions rythmiques. Il est protégé par une membrane, le **péricarde**, qui est attaché au diaphragme et au sternum et constitué de 2 parois : le péricarde fibreux et le péricarde séreux. L'espace entre ces 2 feuillets est virtuel et contient un liquide péricardique évitant les frottements. Le cœur est divisé 4 cavités : les **oreillettes** et les **ventricules** (Figure 3). Le cœur droit est séparé du cœur gauche par le **septum interventriculaire**. L'OD reçoit le sang de tous les organes, excepté les poumons, via les veines caves supérieure et inférieure qui ramènent le sang de la partie supérieure et inférieure du corps. Le sinus coronaire drainant le sang pour le muscle cardiaque, débouche dans cette oreillette. Une fois dans l'OD, le sang passe la valve tricuspide pour entrer dans le VD qui l'éjecte vers les poumons. Après avoir été ré-oxygéné dans les poumons, le sang retourne vers l'OG. Ce sang oxygéné passe la valve mitrale et arrive dans le VG qui va le propulser vers les différents organes via l'aorte.

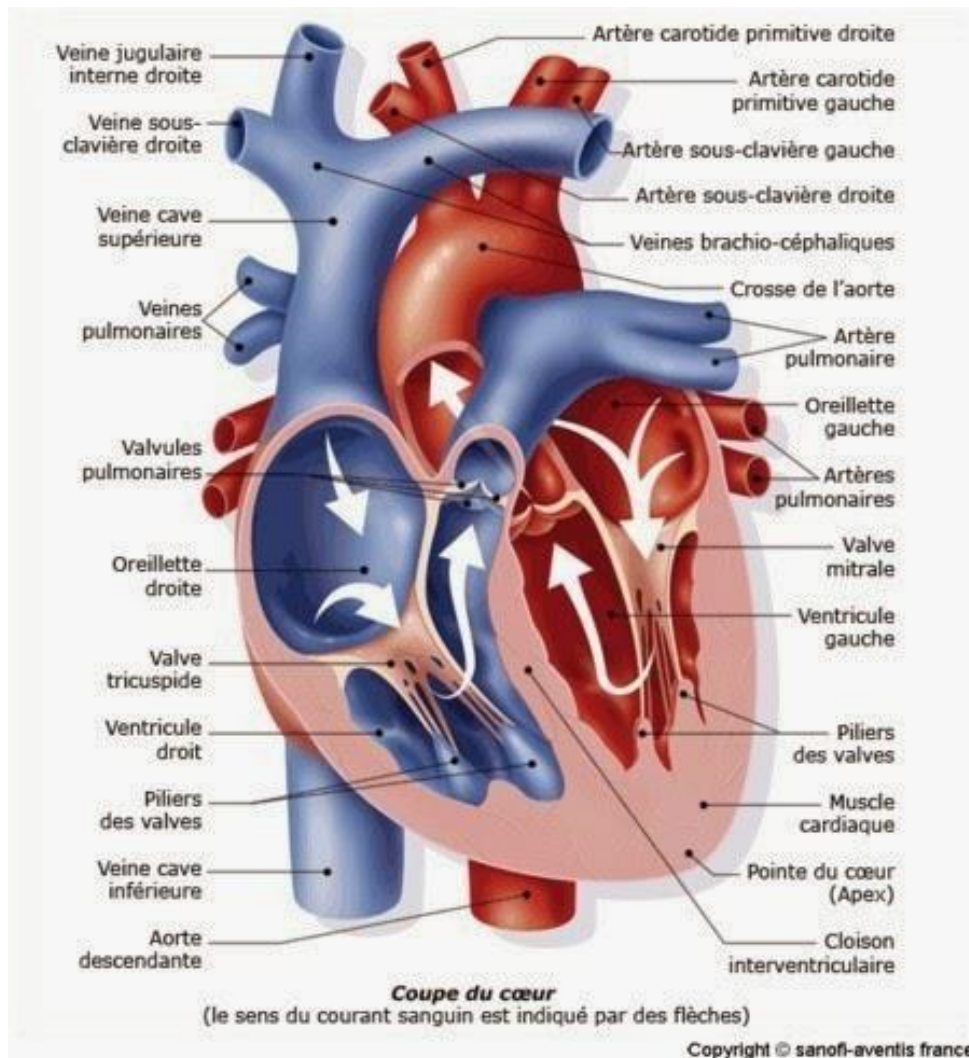


Figure 3 : Schéma détaillé du cœur. Issue de Sanofi.

2. Circulation coronaire

Le muscle cardiaque possède son propre système vasculaire pour recevoir l'oxygène et les nutriments nécessaires au fonctionnement de ses cellules, il s'agit du **système coronaire** (Figure 4 A). Celui-ci est composé de **deux artères coronaires principales**, la droite et la gauche, chacune irriguant respectivement le VD et le VG. Les artères coronaires principales sont issues de l'aorte ascendante (Figure 4 B). L'artère coronaire droite a un diamètre d'environ 2,5 mm et alimente le VD jusqu'au septum interventriculaire. L'artère coronaire gauche présente un diamètre de 4,5 mm, mesure entre 1 et 2 cm avant de se diviser en artère coronaire gauche descendante et en artère coronaire circonflexe, ces dernières irriguant l'ensemble du VG. Le retour veineux s'effectue via les veines cardiaques, présentes

le long du sillon atrioventriculaire et se rejoignant pour former le **sinus coronaire veineux** qui se déverse dans l'OD (Sherwood, Molotchnikoff, et Lockhart 2006).

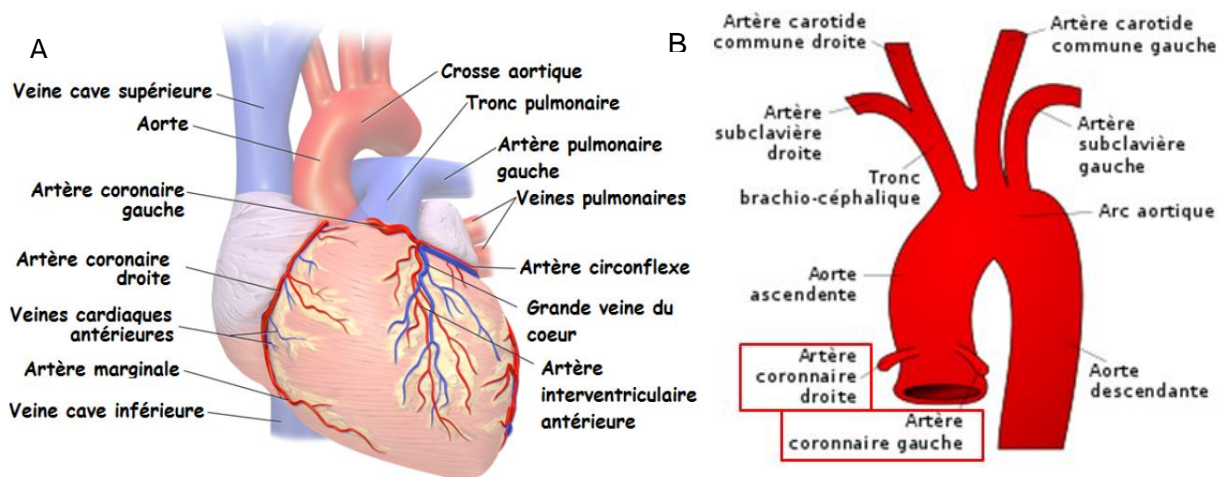


Figure 4 : Circulation coronaire. A : Vue globale de la circulation coronaire cardiaque (issue de <http://ressources.unisciel.fr>) B : Détail de l'origine des artères coronaires gauches et droites (issue de Wikipedia).

3. Cycle cardiaque

Le cycle cardiaque est périodique et se divise en 2 phases principales : la **systole** (contraction) et la **diastole** (relaxation) (Figure 5). Au cours de la systole, 2 phases se succèdent : la **contraction iso-volumique** qui débute par la fermeture de la valve mitrale, le VG est alors clos et se contracte. Quand la pression dans le VG atteint celle de l'aorte, la valve aortique s'ouvre, le sang passe dans l'aorte. C'est la phase d'**éjection ventriculaire**, le sang ayant été éjecté dans l'aorte, la pression dans le VG diminue. La diastole comprend également 2 étapes. Une première phase de **relaxation iso-volumique** au cours de laquelle le VG se relâche, il y a diminution brutale de la pression. La seconde phase est celle du **remplissage ventriculaire** qui s'effectue en 2 temps : un remplissage passif corrélé à l'ouverture de la valve mitrale et un remplissage actif des ventricules par contraction des oreillettes. Au niveau du cœur droit, on observe le même phénomène que celui décrit précédemment (Sherwood, Molotchnikoff, et Lockhart 2006).

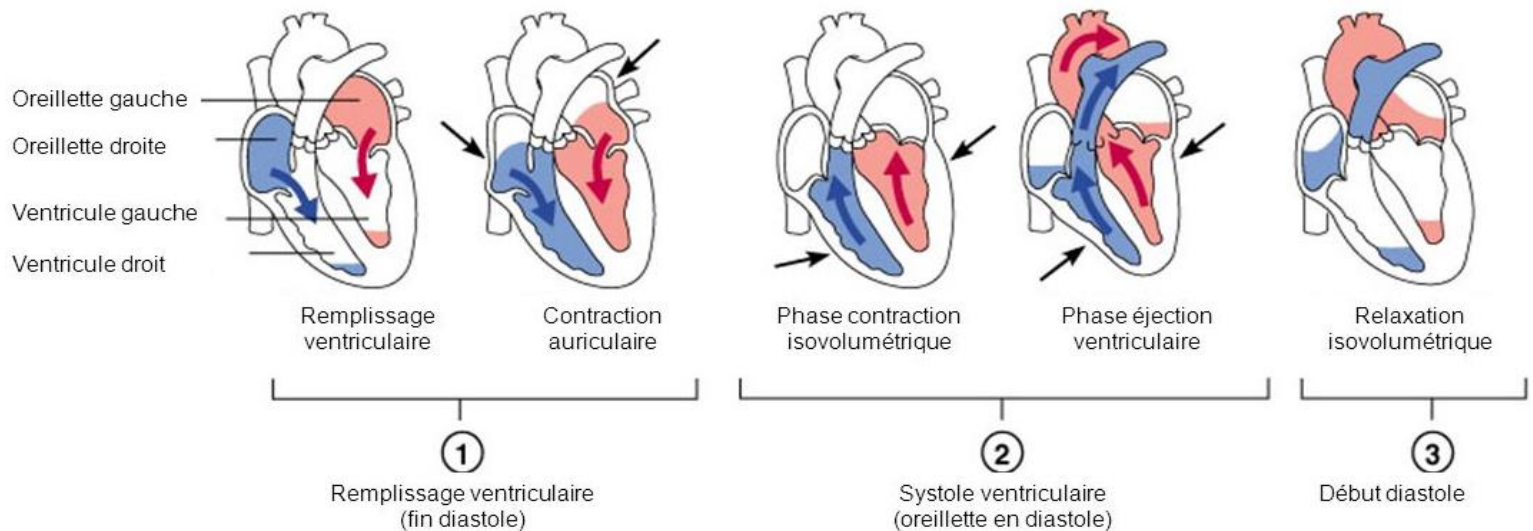


Figure 5 : Déroulement du cycle cardiaque. Adaptée de (« Anatomie et physiologie: une approche intégrée - Michael P. McKinley, Valerie Dean O'Loughlin, Theresa Stouter Bidle - Google Livres » s. d.).

4. Paroi cardiaque

La paroi cardiaque est composée de 3 couches distinctes : l'**épicarde** (surface externe), le **myocarde** (au milieu) et l'**endocarde** (surface interne). L'épicarde est aussi connu sous le nom de péricarde viscéral, sa fonction est de protéger le cœur. L'essentiel de la paroi cardiaque est formé par le myocarde qui est contractile. L'endocarde est une membrane mince et continue tapissant l'intérieur des cavités cardiaques et dont le rôle est d'éviter la coagulation du sang à son contact (Sherwood, Molotchnikoff, et Lockhart 2006).

5. Composition cellulaire du cœur

Le cœur est composé de différents types cellulaires plus ou moins abondants. Les **cardiomyocytes** représenteraient entre 20 et 40% des cellules cardiaques, et occuperaient 70 à 85% du volume total du cœur. Ils ont une forme de cylindre, possèdent un ou plusieurs noyaux et sont reliés entre eux par des disques intercalaires. Les **cellules endothéliales** sont les plus abondantes, environ 60%. Elles ont de nombreux rôles au sein du tissu cardiaque, agissant notamment dans l'homéostasie vasculaire, l'organisation et la survie des cardiomyocytes et lors de la cicatrisation et de la régénération post infarctus. Les **fibroblastes** sont aussi très présents. Leur proportion avait été estimée autour de 20%. Cependant un article récent, qui a utilisé une technique de quantification plus poussée et

plus précise, établit le pourcentage de fibroblastes à 13% (Pinto et al. 2016). Ces résultats suggèrent que le nombre de fibroblastes a été surestimé par le passé du fait d'un manque de marqueurs spécifiques. Les **péricytes**, cellules musculaires lisses servant de support aux capillaires en entourant les cellules endothéliales et qui sont requises lors de l'initiation de l'angiogenèse, représentent environ 5% des cellules du cœur. Enfin, une petite proportion de **cellules immunitaires** résidentes (macrophages, lymphocytes B et T) constitue aussi le tissu cardiaque (Gray et al. 2018) (Pingzhu Zhou et Pu 2016).

Chapitre II : L'hypertension pulmonaire

I. L'hypertension pulmonaire

1. Définition

L'hypertension pulmonaire (HTP) regroupe un ensemble de conditions caractérisées par une **augmentation progressive de la pression artérielle pulmonaire moyenne** (PAPm ≥ 25 mmHg au repos) aboutissant progressivement à une **insuffisance cardiaque droite** et au décès (Figure 6). A titre de comparaison, la PAPm normale au repos est de $14 \pm 3,3$ mmHg (Hoepfer 2015). Ces 2 dernières décennies, des avancées dans la compréhension des mécanismes, des caractéristiques cliniques et des options thérapeutiques ont changé la vision de cette pathologie.

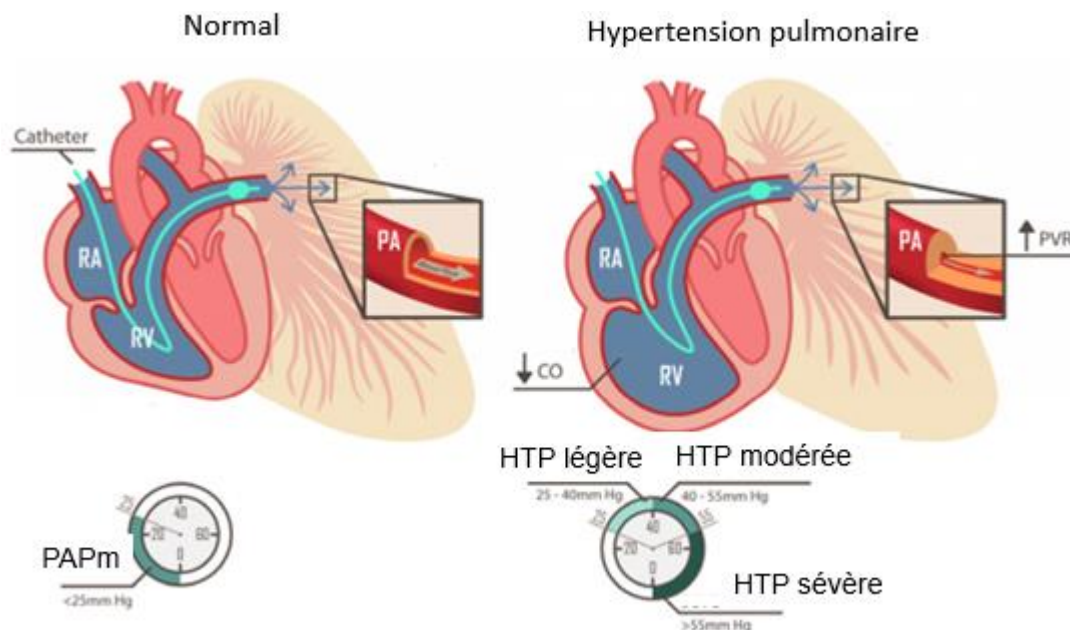


Figure 6: Schéma représentant le système cardiopulmonaire sain et dans le cas de l'HTP. L'hypertension pulmonaire est caractérisée par une PAPm ≥ 25 mmHg mesurée par cathétérisme cardiaque droit. Le remodelage vasculaire pulmonaire est responsable d'une augmentation de la pression vasculaire pulmonaire (PVR). Pour faire face à ces modifications, le VD s'hypertrophie et se dilate. Adaptée de (Lai et al. 2014).

2. Classification

Auparavant, l'HTP était classifiée en 2 catégories : l'HTP primaire et l'HTP secondaire, selon la présence ou non de causes ou facteurs de risque identifiés. Depuis le symposium mondial sur l'HTP en 1998, un système de classification a été développé et a subi de nombreuses

révisions au fil des années. La dernière classification a été mise en place au 5^{ème} symposium mondial sur l'HTP qui s'est tenu à Nice en 2013. Cette classification clinique a été établie pour individualiser les différentes catégories d'HTP selon leurs caractéristiques pathologiques, hémodynamiques et de prise en charge. Aujourd'hui, l'HTP est subdivisée en 5 groupes (Figure 7) :

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

Figure 7 : Classification détaillée des HTP selon le symposium de Nice 2013. Issue de (Gerald Simonneau et al. 2013).

- 1) **Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)** : pour laquelle l'élévation de la PAPm est liée à un obstacle en amont des capillaires pulmonaires et qui présente une pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) ≤ 15 mmHg, il s'agit d'une HTP pré-capillaire (Figure 8). Pour le détail des anomalies voir Figure 9.
- 2) **Hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche** : pour laquelle l'élévation de la PAPm est secondaire à une élévation de pression en aval des capillaires pulmonaires et caractérisée par une PAPO > 15 mmHg, il s'agit d'une HTP post-capillaire (Figure 8)
- 3) **Hypertension pulmonaire associée à des maladies pulmonaires chroniques et/ou une hypoxie**
- 4) **Hypertension pulmonaire post-embolique (HPPE)**, conséquence d'une obstruction artérielle pulmonaire chronique
- 5) **Hypertension pulmonaire caractérisée par des mécanismes multifactoriels incertains**

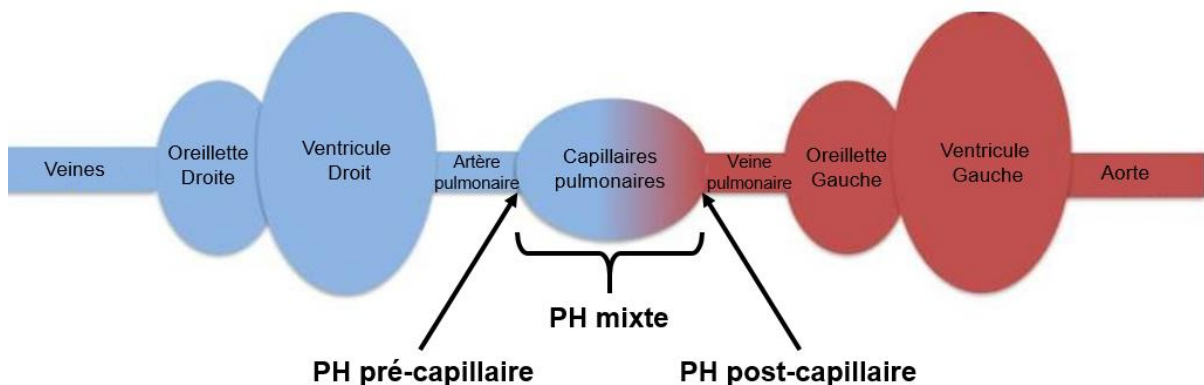


Figure 8 : Description des HTP pré et post capillaires. L'HTP pré-capillaire est due à une obstruction au niveau des artères pulmonaires, en amont des poumons. En revanche, l'HTP post-capillaire est causée par un obstacle présent à la sortie des poumons.

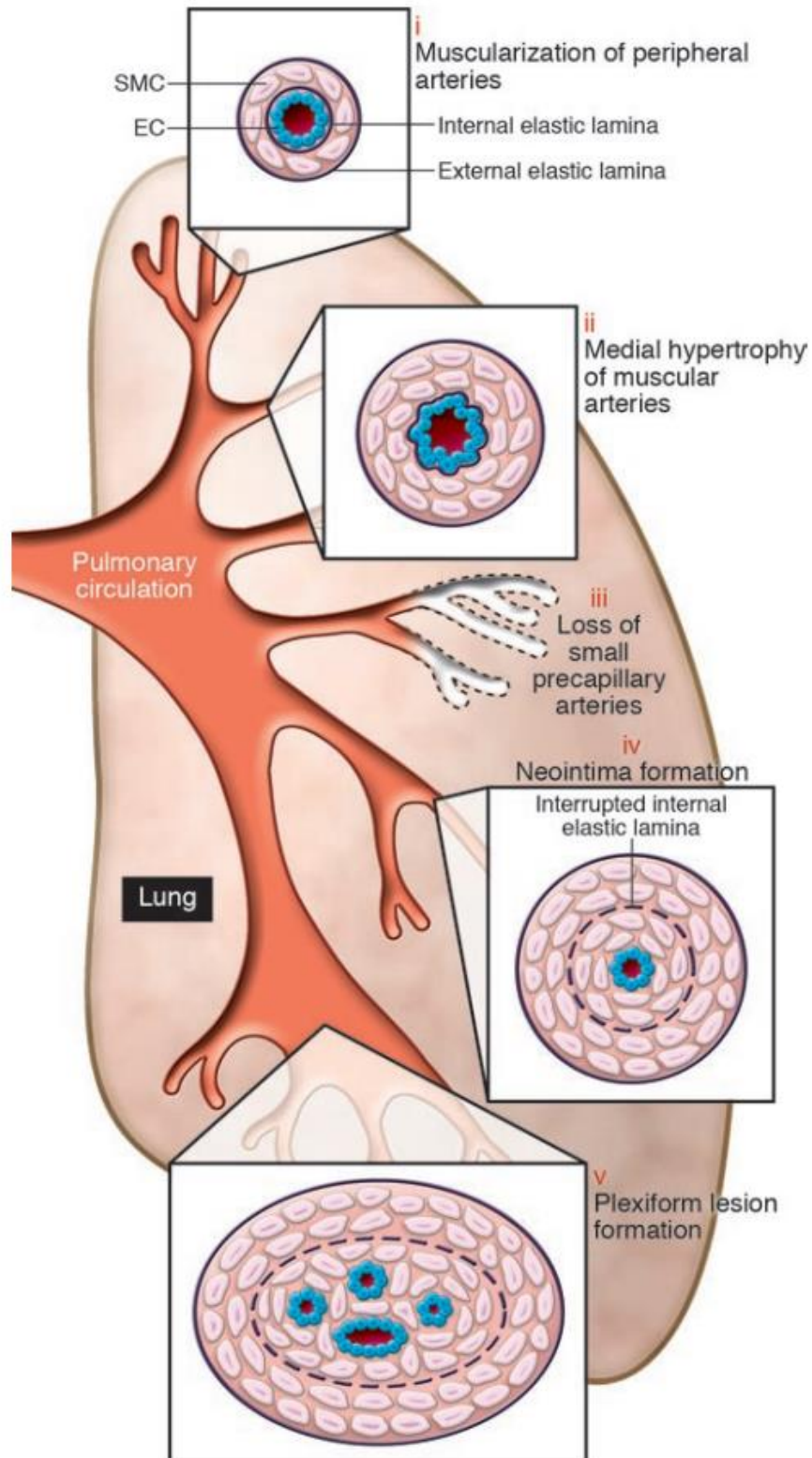


Figure 9 : Modifications pulmonaires dans l'HTAP. L'HTAP est caractérisée par plusieurs anomalies structurelles et fonctionnelles des artères pulmonaires : (i) musculation anormale des artères distales, (ii) hypertrophie de la media des grosses artères, (iii) raréfaction des artères précapillaires, (iv) formation d'une néo-intima occlusive, (v) formation de lésions plexiformes liée à la prolifération de cellules endothéliales dans les grosses artères. Issue de (Rabinovitch 2008) .

3. Symptômes

Les signes fonctionnels permettant d'évoquer une HTP sont très peu spécifiques et apparaissent initialement lors de l'effort : dyspnée, fatigue, syncope et douleurs thoraciques. En cas d'état avancé de la pathologie, des signes d'insuffisance cardiaque droite peuvent apparaître : œdème, turgescence jugulaire, reflux hépato-jugulaire, hépatalgie et ascite (Jutant et Humbert 2016). Une classification a été mise en place par la « World Health Organization » pour déterminer à quel point les patients sont atteints physiquement.

Classification	Limitation de l'activité physique
I	Aucune limitation
II	Légère
III	Marquée
IV	Aucune activité physique possible

4. Diagnostic

L'HTP est recherchée lorsqu'un patient présente une **dyspnée non expliquée**, des épisodes de syncope ou des signes d'insuffisance cardiaque. **L'intolérance à l'exercice** étant l'une des principales caractéristiques de l'HTP, un test mesurant la distance parcourue en 6 minutes est couramment utilisé comme critère d'évaluation (Rubin 2012). Ensuite, **l'échocardiographie** reste l'examen non invasif le plus employé pour dépister les patients atteints (Figure 10). Lorsque le diagnostic d'HTP est validé, dans un premier temps les causes les plus fréquentes sont recherchées : maladie du cœur gauche (HTP groupe 2) ou maladie respiratoire chronique (HTP groupe 3). Si aucune de ces causes n'est validée, une **scintigraphie pulmonaire** va permettre de diagnostiquer une HPPE (groupe 4) en identifiant ou non la présence de défauts de perfusion. Si la scintigraphie pulmonaire est normale, l'étape suivante consiste en la réalisation d'un **cathétérisme cardiaque droit** pour déterminer le caractère pré- ou post-capillaire de l'HTP. En cas d'HTP pré-capillaire, un bilan est réalisé afin de rechercher une cause potentielle. Si aucune cause n'est trouvée, l'HTP est considérée comme idiopathique. Tous ces examens ont pour but de cibler de manière optimale la pathologie dont le patient est atteint afin de lui proposer un traitement adapté (Seferian et Simonneau 2014).

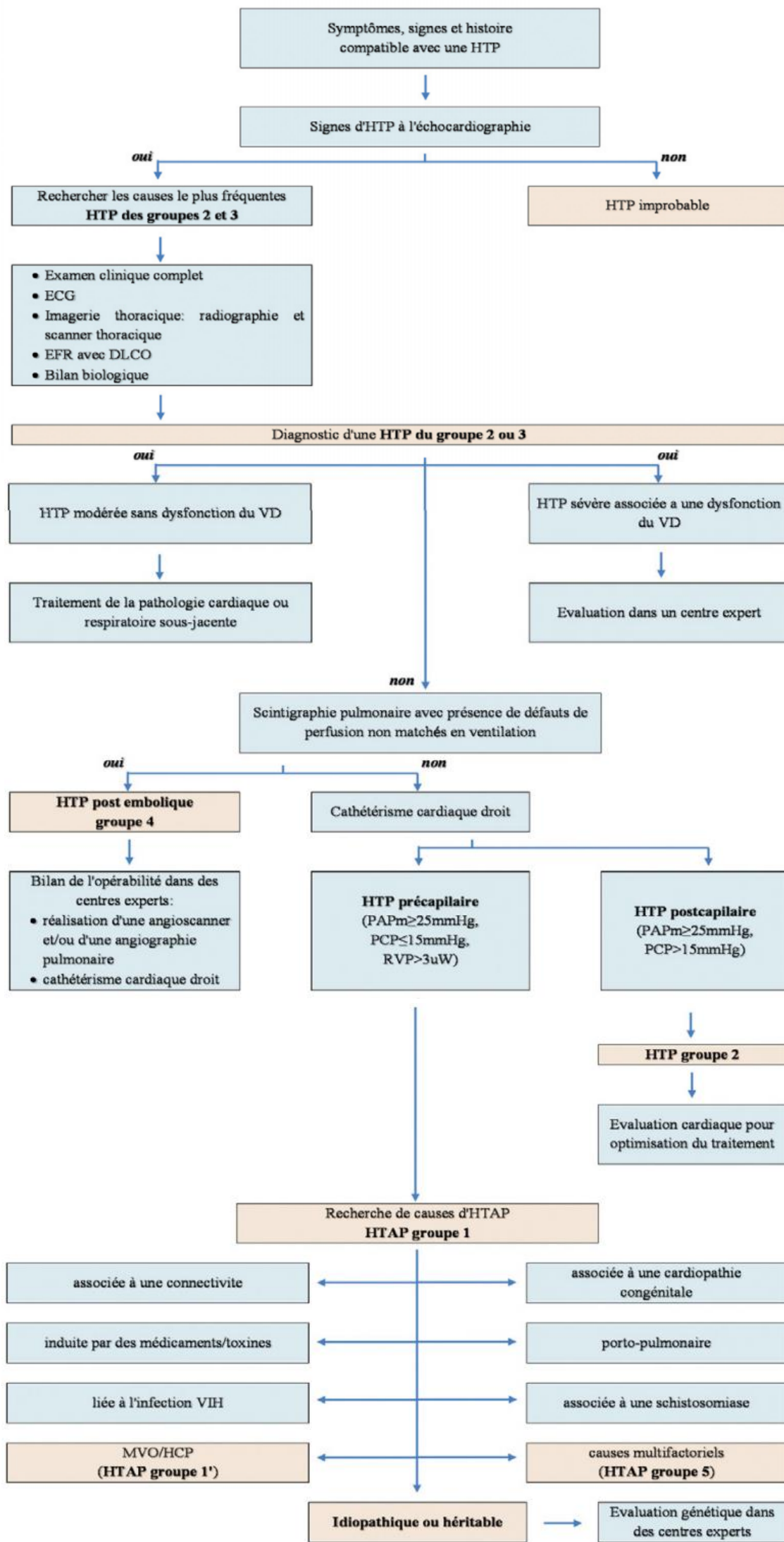


Figure 10 : Algorithme de diagnostic de l'HTP. Issu de (Seferian et Simmoneau, 2014).

II. Détail de l'Hypertension Pulmonaire Post-Embolique (HPPE)

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur un modèle porcin d'HPPE, car il s'agit du seul modèle de gros animal d'HTP reproduisant au mieux cette pathologie. J'ai donc choisi de décrire en détail cette forme distincte d'HTP ci-après.

1. Définition et épidémiologie

L'HPPE est une forme distincte d'HTP caractérisée par une **obstruction mécanique des artères pulmonaires**, due à la présence de thrombus fibreux solidement attachés à la media, et par une **artériopathie des petits vaisseaux**. Ce matériel thromboembolique peut complètement occlure la lumière des artères touchées et former des réseaux (Figure 11). Dans certains cas, il y a une recanalisation partielle des artères touchées. Cette occlusion des artères pulmonaires mène à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) entraînant la mise en place progressive d'une HTP et une insuffisance cardiaque droite potentiellement fatale (I. Lang 2015). L'HPPE fait partie du groupe 4 de la classification de l'HTP, il s'agit d'une forme d'HTP pré-capillaire (Mahmud et al. 2018).

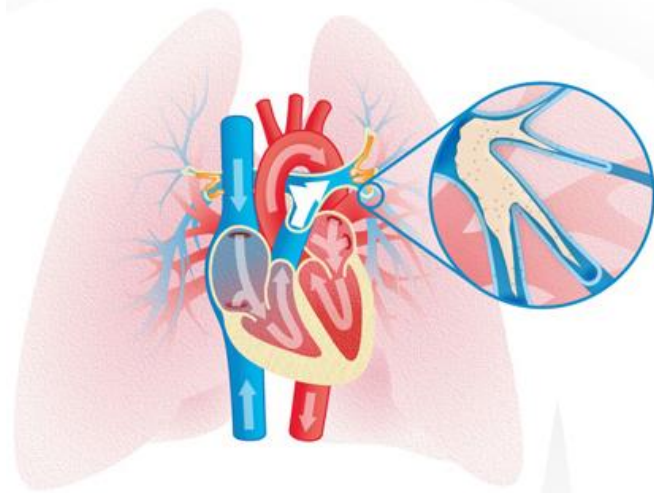


Figure 11 : Schéma de la présence d'un matériel thromboembolique dans l'artère pulmonaire, caractéristique de l'HPPE. Issue de www.cteph.co.

L'HPPE constitue une pathologie rare, très probablement sous-diagnostiquée. Les prévalence et l'incidence exactes de l'HPPE sont inconnues mais des données suggèrent

que l'incidence annuelle est de 3 à 30 personnes par million (O'Connell et al. 2015). Bien que la pathogénèse de l'HPPE ne soit pas encore entièrement élucidée, on sait aujourd'hui qu'elle survient parfois suite à une ou plusieurs embolies pulmonaires aiguës résultant de thrombo-embolies veineuses (Figure 12) (I. Lang 2015). Il semblerait que la pathologie se développe chez 0,56 à 3,2% des patients ayant subi une ou plusieurs embolies pulmonaires. Cependant, de nombreux cas d'HPPE se développent sans histoire préalable d'HTP et sans signe de maladie chronique au moment du diagnostic. L'historique d'embolie pulmonaire chez les patients HPPE est donc discutable. Etant donné que la majorité des patients ayant subi une embolie pulmonaire ne présentent pas d'HPPE, il semblerait que plusieurs facteurs de risque contribuent à son développement (Mahmud et al. 2018) (Tableau 1).

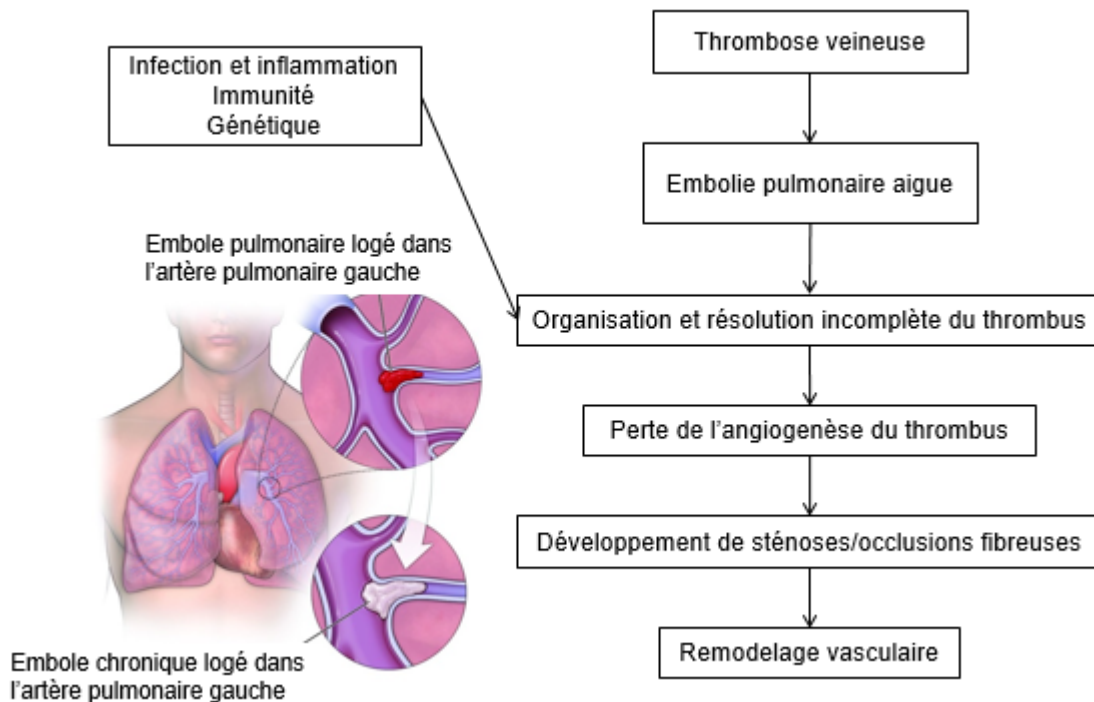


Figure 12 : Schéma du concept pathophysiologique de l'HPPE. Suite à une thrombose veineuse, une embolie pulmonaire aiguë survient. Dans certains cas le thrombus ne se résout pas, ou seulement partiellement. Il évolue, il n'est plus irrigué et devient fibreux, occluant complètement ou partiellement l'artère pulmonaire dans laquelle il est logé. Adaptée de Lang (I. Lang 2015) et de heart.templehealth.org.

Facteurs de risque impliqués dans le développement de l'HPPE
Embolie pulmonaire aigue Embolies pulmonaires récurrentes Défaut de perfusion important Pression artérielle pulmonaire plus haute qu'au moment du diagnostic initial d'embolie pulmonaire Embolie pulmonaire idiopathique
Facteurs de risques hémostatiques Elévation du facteur VIII, facteur de von Willebrand, plasminogène activateur/inhibiteur de type 1 Structure du fibrinogène anormale Anticorps anti-phospholipide et anticoagulant lupus Groupe sanguin autre que groupe O Elévation des lipoprotéines
Conditions médicales associées Splénectomie Shunt ventriculo-artériel Cathéters/dispositifs intraveineux infectés Maladie chronique inflammatoire Hypothyroïdisme Cancer

Tableau 1 : Résumé des facteurs de risque impliqués dans le développement de l'HPPE. Adapté de (Mahmud et al. 2018).

L'HPPE est considérée comme une maladie vasculaire pulmonaire à 2 composantes, avec initialement **(1) une occlusion des vaisseaux proximaux due à une mauvaise résolution d'une embolie pulmonaire, qui déclenche (2) une artériopathie pulmonaire distale** (Auger, Mandel, et Pepke-Zaba 2016).

(1) La cause de la non-résolution du thrombus suite à une embolie pulmonaire nécessite encore d'être clarifiée. Le mécanisme normal de résolution d'un thrombus (fibrinolyse > formation du tissu de granulation > recrutement de leucocytes et de progéniteurs endothéliaux > angiogenèse) pourrait être altéré par la présence d'une inflammation, régulée à la hausse chez les patients HPPE. Différentes versions de fibrinogène, plus résistants au clivage et à la résolution, ont aussi été observées chez ces patients. De plus, il a été retrouvé dans des thrombus de patients HPPE des cellules sécrétant du collagène. Celles-ci pourraient participer à la formation d'un microenvironnement altérant la fonction des cellules endothéliales. Ainsi, ces dernières n'effectuent plus le processus d'angiogenèse (I. Lang 2015) (O'Connell et al. 2015).

(2) A cause de l'obstruction persistante dans les artères pulmonaires, le flux sanguin pulmonaire est redistribué aux vaisseaux non obstrués. Par conséquent, ces vaisseaux pulmonaires font face à une augmentation de la pression sanguine et à une augmentation des contraintes de cisaillement. Il en résulte le développement progressif d'une artériopathie dans les artères distales et les artérioles. Les capillaires pulmonaires présentent alors un remodelage vasculaire (épaississement des 3 couches de la paroi du vaisseau du à l'hypertrophie et la prolifération des différents types cellulaires présents) et une dysfonction endothéliale (I. Lang 2015) (O'Connell et al. 2015) (I. M. Lang, Dorfmueller, et Vonk Noordegraaf 2016).

Le processus de remodelage du VD en HPPE est relativement lent car il est lié à l'évolution des RVP (I. M. Lang, Dorfmueller, et Vonk Noordegraaf 2016).

2. Signes cliniques et diagnostic

a. Signes cliniques

Comme pour d'autres formes d'HTP, les patients atteints d'HPPE présentent une dyspnée progressive, une tolérance à l'exercice réduite et des douleurs thoraciques. Ils peuvent présenter un état de fatigue et connaître des épisodes de syncope et/ou d'hémoptysie. Avec la progression de la maladie, la dysfonction ventriculaire droite devient de plus en plus prononcée et peut se manifester à un stade d'insuffisance ventriculaire droite associant une distension de la veine jugulaire, une hépatomégalie, une ascite ou un œdème périphérique. Les symptômes de l'HPPE n'étant pas spécifiques à cette pathologie, elle est souvent diagnostiquée à un stade avancé (I. Lang 2015) (Mahmud et al. 2018). De plus, il y a souvent une longue période asymptomatique, pouvant durer des mois ou des années. Cette période se termine généralement quand plus de 40% du lit vasculaire pulmonaire est obstrué (O'Connell et al. 2015). Ce qui explique aussi le fait que la pathologie est généralement diagnostiquée à un stade avancé.

b. Diagnostic (Figure 13)

Baser le diagnostic de l'HPPE seulement sur l'historique et l'examen physique du patient est difficile. Une **radiographie pulmonaire** et des études de la fonction pulmonaire sont utiles pour exclure une pathologie du parenchyme pulmonaire ou des voies respiratoires (Figure 14 A). Un **électrocardiogramme** peut montrer des résultats associés à l'HTP ou à d'autres troubles cardiaques (Figure 14 B). Pour identifier une HTP et une dysfonction cardiaque droite, une **échocardiographie** transthoracique doit être réalisée afin d'estimer la pression systolique du VD, les tailles de l'OD et du VD et leurs fonctions, ainsi que le mouvement du septum interventriculaire (Figure 14 C). Les algorithmes de diagnostic recommandent d'effectuer une **scintigraphie de ventilation/perfusion pulmonaire**, examen crucial de dépistage de l'HPPE. Il est très sensible pour détecter les anomalies de perfusion et une imagerie normale permet d'éliminer le diagnostic d'une HPPE (Figure 14 D). Cependant, ce test n'étant pas spécifique à l'HPPE, d'autres examens sont requis pour établir le diagnostic. Une **angiographie pulmonaire** et/ou un angioscanner pulmonaire sont nécessaires pour caractériser le type et la localisation de l'atteinte vasculaire pulmonaire (Figure 14 E). Enfin, un **cathétérisme cardiaque droit** est indispensable pour établir de manière précise la sévérité de l'hémodynamique et confirmer qu'il s'agit d'une HTP pré-capillaire (Figure 14 F) (Auger, Mandel, et Pepke-Zaba 2016) (Mahmud et al. 2018).

En conclusion, le diagnostic de l'HPPE est établi chez un patient lorsque celui-ci a été sous anticoagulants pendant au moins 3 mois, qu'il présente une PAPm ≥ 25 mmHg au repos, que sa pression capillaire pulmonaire est inférieure ou égale à 15 mmHg et qu'il est atteint d'une maladie thromboembolique chronique avec la présence d'occlusions vasculaires multiples (O'Connell et al. 2015).

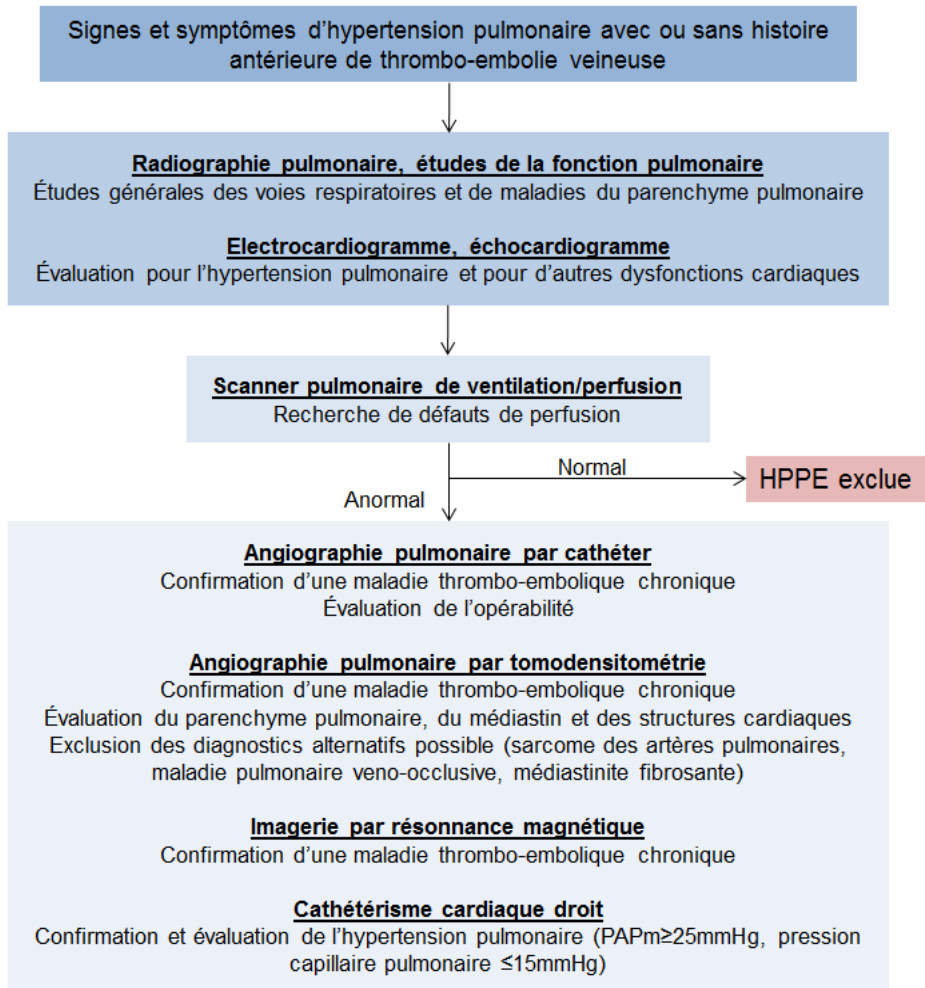


Figure 13 : Examens à effectuer pour établir le diagnostic d'une HPPE. Adaptée de (Mahmud et al. 2018).

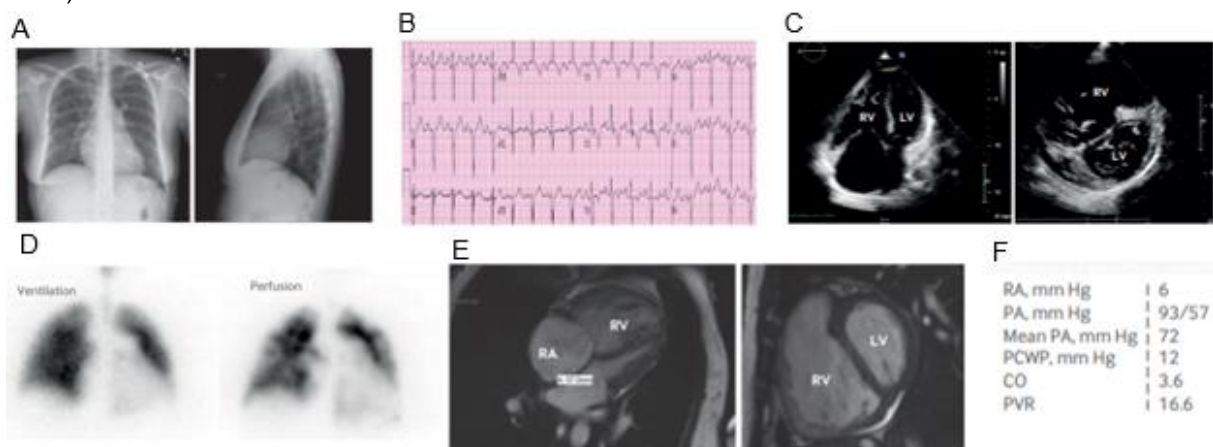


Figure 14 : Résultats d'examens établissant le diagnostic d'une HPPE. A : Radiographie pulmonaire révélant un élargissement de l'artère pulmonaire et une dilatation des vaisseaux pulmonaires distaux. B : Electrocardiogramme. C : Echocardiographie 4 cavités montrant une dilatation du VD. D : Scanner ventilation/perfusion qui révèle des défauts de perfusion. E : IRM montrant une dilatation et une hypertrophie du VD et l'invagination du septum interventriculaire. F : Résultats d'un cathétérisme cardiaque droit : pressions artérielles et résistance vasculaire pulmonaire élevées. Adaptée de (Thenappan et al. 2018).

3. Traitements

Une fois le diagnostic de l'HPPE posé, il est nécessaire d'établir une stratégie thérapeutique à l'aide de l'algorithme de traitement ci-dessous (Figure 15).

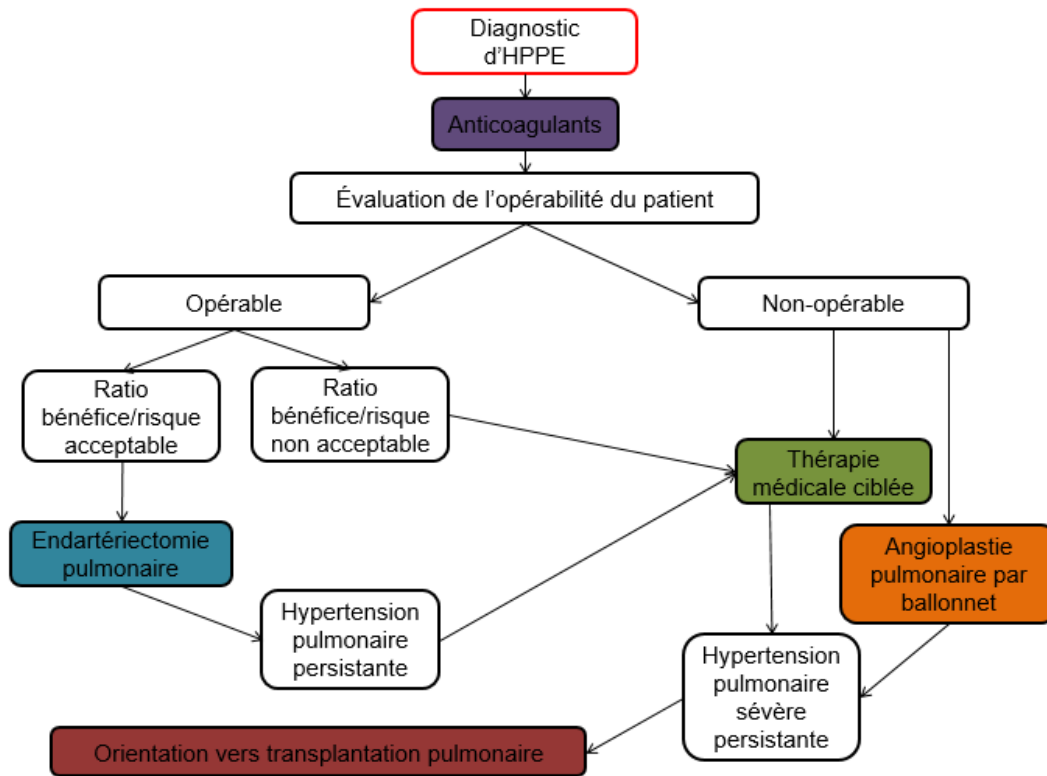


Figure 15 : Algorithme de traitement utilisé pour l'HPPE. Adaptée de (Witkin et Channick 2015) et (Galiè et al. 2016).

a. Endartériectomie

L'endartériectomie pulmonaire constitue le traitement de référence pour les patients atteints d'HPPE car elle est susceptible de les guérir. Cet acte chirurgical, consistant à ôter le matériel thromboembolique des artères pulmonaires obstruées (Figure 16), est associé à une réduction du taux de mortalité et conduit à des améliorations de l'hémodynamique pulmonaire et de la condition physique des patients opérés (Hoeper 2015).

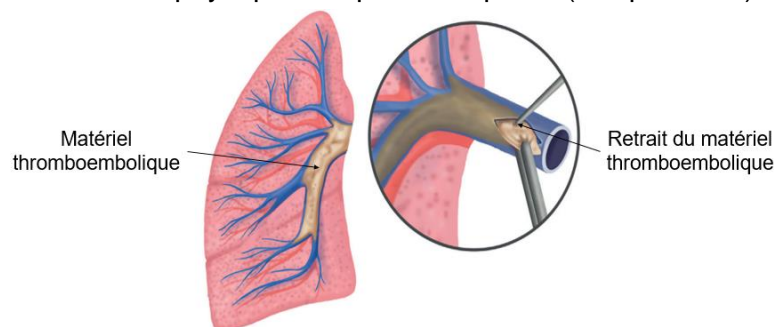


Figure 16 : Schéma de la procédure d'endartériectomie pulmonaire. Le matériel thromboembolique est retiré des artères qu'il obstrue. Adaptée de (Mahmud et al. 2018).

La procédure est réalisée via une sternotomie médiane suivie d'une circulation extra-corporelle et d'une hyperthermie profonde. Le patient est mis en arrêt circulatoire afin qu'il n'y ait plus de flux sanguin dans les artères obstruées le temps de la dissection. Le plan d'endartériectomie est ensuite disséqué des vaisseaux proximaux vers les distaux pour enlever le matériel obstructif (Figure 17). La mortalité post endartériectomie dans les centres expérimentés est basse (de 2,2% à 6,7% selon les études) (Witkin et Channick 2015) (D'Armini et al. 2014).

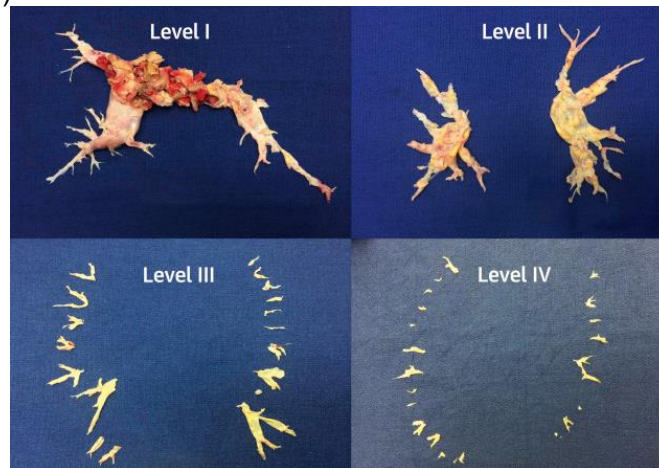


Figure 17 : Matériel thromboembolique retiré de l'arbre vasculaire pulmonaire lors de l'endartériectomie. Représentation du plus proximal (level I) ou plus distal (level IV). Issue de (Mahmud et al. 2018).

Cependant, tous les patients ne sont pas éligibles à cette procédure. Pour certains, les obstructions sont trop distales pour qu'elles soient accessibles par chirurgie, d'autres présentent des comorbidités rendant l'opération trop risquée, et une certaine proportion de patients refusent d'effectuer cette procédure (Hoepfer 2015). L'existence d'une dysfonction cardiaque droite n'est pas une contre-indication à la chirurgie (Witkin et Channick 2015). Cependant, les patients HPPE ayant cette dysfonction droite présentent un taux de mortalité plus élevé suite à cette procédure (de Perrot et al. 2015). A ce jour, il n'y a pas de critère bien défini pour déterminer si les patients sont éligibles ou non à l'endartériectomie. L'évaluation de l'opérabilité des patients se discute en réunions pluridisciplinaires associant chirurgiens, cathétériseurs et pneumologues spécialistes de la pathologie.

b. Angioplastie pulmonaire à ballonnet

La première étude sur l'angioplastie pulmonaire pour les patients HPPE date de 2001 et les patients avaient présentés de nombreuses complications : un œdème de reperfusion pulmonaire est survenu chez 11 patients sur 18 et 3 ont nécessité une ventilation mécanique (Feinstein et al. 2001). A la suite des résultats de cette étude, l'angioplastie pulmonaire a été abandonnée pendant quelques années (I. Lang et al. 2017) (Mahmud et al. 2018).

Ces dernières années, des rapports japonais ont ravivé l'intérêt de cette procédure. La technique a été améliorée et les résultats sont plus encourageants, avec une amélioration des symptômes, de la distance parcourue en 6 minutes et de l'hémodynamique des patients traités. De plus, la réduction de la PAPm induite par cette technique entraîne une amélioration de la fonction du VD (Nishiyama et al. 2018). Enfin, l'incidence d'œdème de reperfusion pulmonaire est tombée à 2% et la mortalité a baissé (O'Connell et al. 2015) (Tanabe et al. 2018).

Pour pratiquer l'angioplastie, l'accès vasculaire percutané s'effectue via la veine fémorale ou jugulaire à l'aide d'un cathéter guide. Il est demandé aux patients de retenir leur souffle pendant quelques secondes pour permettre au cathéter d'entrer dans les branches les plus distales du lobe pulmonaire. Le guide est ensuite passé précautionneusement à travers le réseau sténosé. Après avoir vérifié son emplacement exact, le ballon est gonflé pour écraser le matériel thrombotique et ainsi augmenter la lumière du vaisseau, permettant au sang de recirculer (Figure 18). Pour atteindre la réduction de PAPm désirée et traiter tous les lésions accessibles, 3 à 10 sessions d'angioplastie sont généralement nécessaires, espacées par des intervalles de temps supérieurs à une semaine (I. Lang et al. 2017).

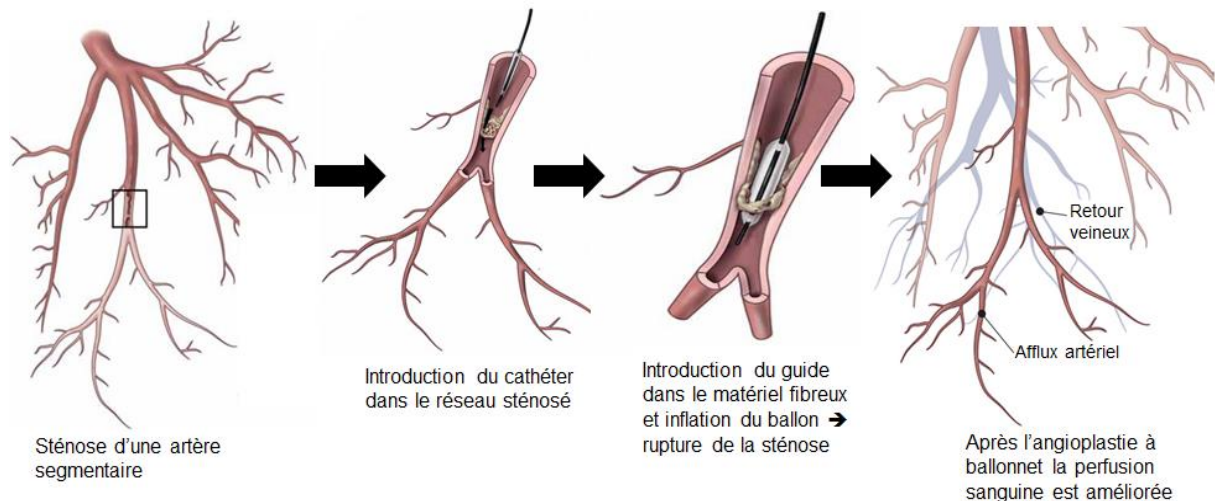


Figure 18 : Schéma du déroulement d'une angioplastie pulmonaire à ballonnet. Adaptée de (I. Lang et al. 2017).

Les patients candidats à l'angioplastie pulmonaire sont ceux non opérables par endartériectomie due à la distribution distale de l'obstruction vasculaire ; ceux pour qui l'endartériectomie présente un ratio bénéfice/risque défavorable dû à des comorbidités ; ceux avec un HTP persistante/récurrente suite à une endartériectomie ; ceux pour qui l'endartériectomie a été un échec ; ceux qui présentent des lésions résiduelles suite à l'endartériectomie ; et ceux pour qui la thérapeutique médicamenteuse ne fonctionne pas. A l'inverse, l'angioplastie pulmonaire ne doit pas être proposée aux patients avec un thrombus important ou qui ont une occlusion unilatérale totale (I. Lang et al. 2017).

Malgré l'évolution certaine de cette technique ces dernières années, de nombreuses questions demeurent sans réponses à propos de l'efficacité de l'angioplastie par rapport à l'endartériectomie. Il faut notamment standardiser la procédure, mieux définir la population cible, le rôle des thérapies médicamenteuses et obtenir des données sur les conséquences à long terme.

c. Traitements médicamenteux

i. Rationnel pour une thérapie médicamenteuse

Voici ici une très brève description des voies de signalisation dysfonctionnelles au niveau pulmonaire, justifiant l'utilisation de thérapies médicamenteuses.

Le NO (oxyde nitrique) est un régulateur clé de la vasodilatation dans les poumons. Il se lie aux guanylate cyclases (GC) solubles qui catalysent la synthèse du médiateur vasoactif guanosine monophosphate cyclique (GMP). La GMP, via sa protéine kinase, induit la déphosphorylation de la myosine contractile dans le muscle lisse vasculaire, ce qui entraîne la relaxation de la paroi vasculaire. Dans l'HTP, la dysfonction endothéliale pulmonaire perturbe la synthèse du NO et entraîne une diminution de la stimulation de la voie NO-GC-GMP (Hoeper 2015).

La famille des enzymes phosphodiésthérases (PDE), dégrade et inactive le GMP. La PDE-5 est surexprimée dans le muscle lisse vasculaire pulmonaire en HTP, par conséquent la GMP et la relaxation de la paroi vasculaire sont diminuées (Hoeper 2015).

Les patients HTP présentent une augmentation de l'expression de l'endothéline-1 (ET-1), un neuropeptide sécrété par l'endothélium vasculaire, ayant un effet vasoconstricteur puissant sur les cellules musculaires lisses. Le taux plasmatique d'ET-1 est corrélé à l'hémodynamique et à la sévérité de l'HTP et de l'HPPE (Hoeper 2015).

L'expression de la prostacycline, un vasodilatateur pulmonaire puissant synthétisé par l'endothélium pulmonaire, est diminuée en HTP (Hoeper 2015).

ii. Anticoagulation

Le traitement médicamenteux de base pour les patients HPPE consiste en une anticoagulation permanente complétée par des diurétiques en cas d'insuffisance cardiaque. Le but de l'anticoagulation est de prévenir la survenue d'une embolie pulmonaire ou veineuse. Bien qu'aucun essai clinique randomisé n'ait été réalisé sur des patients HPPE, les antagonistes de la vitamine K sont couramment utilisés chez ces patients et réduisent le risque d'embolie. Aujourd'hui, plusieurs patients reçoivent des nouveaux anticoagulants oraux mais aucun essai clinique n'a démontré leur efficacité. L'anticoagulation optimale, sûre et efficace pour l'HPPE doit encore être affinée (Kim et Simonneau 2016) (Pepke-Zaba, Ghofrani, et Hoeper 2017).

iii. Riociguat

Les traitements médicaux sont essentiellement envisagés pour les patients ayant une HPPE persistante/récurrente suite à une endartériectomie ou pour les cas non opérables. Bien que déjà utilisé pour les patients atteints d'HTP, l'essai clinique randomisé, en double aveugle et multicentrique de phase III CHEST-1 (Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Soluble Guanylate Cyclase-Stimulator Trial-1) a étudié l'effet du riociguat sur 261 patients avec une HPPE non opérable ou une HTP persistante/récurrente suite à une endartériectomie. Le riociguat est un stimulateur des GC qui augmente leur sensibilité au NO endogène. Ceci entraîne une vasodilatation, ainsi que des effets anti-fibreux, antiprolifératif et anti-inflammatoire (Witkin et Channick 2015) (Hoeper 2015). Une amélioration de la distance parcourue en 6 minutes ainsi qu'une diminution des RVP par rapport au groupe placebo ont été observées 16 semaines après le traitement (Mayer et al. 2013). Une étude de prolongation de la phase III, CHEST-2, a été réalisée et a montré que l'amélioration de la distance parcourue en 6 minutes était maintenue jusqu'à un an et que le taux de survie était de 97% (Gérald Simonneau et al. 2015). Les dernières études, réalisées après 2 ans de traitements, montrent que les effets bénéfiques sont maintenus. Le riociguat est à ce jour le seul médicament approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), en Europe et dans plusieurs autres pays pour le traitement de l'HPPE (Hoeper 2015).

iv. Bosentan

Avant cette approbation pour le riociguat par la FDA, des médicaments approuvés pour l'HTP étaient prescrits aux patients HPPE. Une étude réalisée sur 6 pays européens a montré que 60% des patients HPPE ont reçu un antagoniste du récepteur de l'ET (bosentan), 34% un inhibiteur du PDE-5 (sildenafil) et 6% un analogue de la prostacycline (epoprostenol) entre 2006 et 2009 (Hoeper 2015). Ces thérapies sont souvent prescrites aux patients présentant une hémodynamique très altérée avant d'envisager une

endartériectomie, bien que les données suggèrent qu'elles n'ont pas un impact significatif sur les suites opératoires (Jensen et al. 2009).

Le seul autre essai clinique de phase III randomisé ayant étudié l'efficacité d'un traitement sur les patients HPPE est l'essai BENEFIT (Bosentan Effect in Inoperable Forms of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension). Cet essai a évalué l'effet du bosentan, un antagoniste du récepteur à l'endothéline, chez 157 patients présentant une HPPE inopérable ou persistante/récurrente. Les résultats ont démontré une diminution des RVP mais pas d'amélioration de la distance parcourue en 6 minutes (Jaïs et al. 2008). N'ayant pas révélé d'effet bénéfique clinique concret, l'utilisation du bosentan n'est pas approuvée chez les patients HPPE à ce jour (Hoeper 2015).

v. Sildenafil

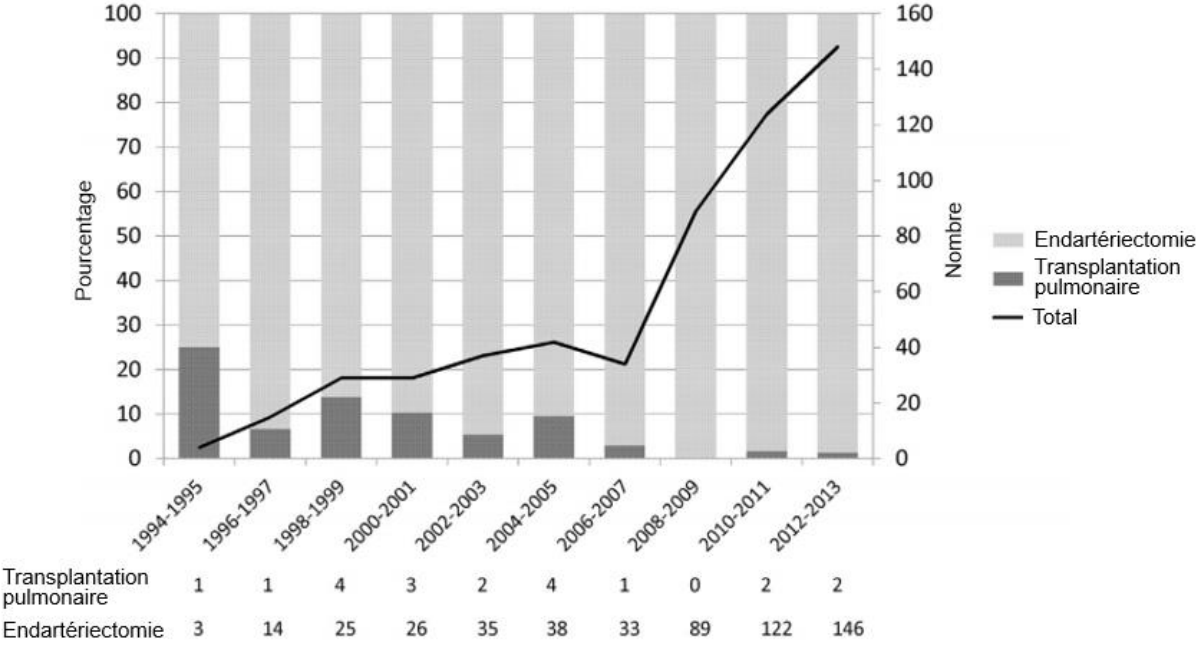
Un essai clinique randomisé a permis d'évaluer l'efficacité du sildenafil, un inhibiteur de PDE-5, chez 19 patients atteints d'HPPE non opérables traités pendant 12 semaines (Suntharalingam et al. 2008). Cependant, cette étude, constituée d'un effectif insuffisant, n'a pas révélé de différence entre le groupe traité et le groupe placebo concernant la distance parcourue en 6 minutes. Seule une amélioration des RVP a été observée. Une étude à plus grande échelle est requise pour confirmer ces observations.

D'autres essais cliniques sur des patients HPPE sont en cours. Cependant, la taille de leurs cohortes est limitée, les essais ne sont pas réalisés en aveugle ni randomisés et certains manquent d'un groupe contrôle. De plus, leurs résultats sont divergents (Hoeper 2015).

d. Transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire

D'Armini et al. ont réalisé une étude rétrospective de 1994 à 2014 sur le traitement chirurgical de l'HPPE au sein de leur centre en Italie. Cette étude révèle qu'au fur et à mesure des années, le nombre d'endartériectomies augmente au détriment des transplantations pulmonaires (Figure 19). La transplantation pulmonaire constitue la seule alternative pour les patients jeunes considérés comme inopérables et inaccessibles à l'angioplastie. Cependant, étant donné l'évolution de la technique d'endartériectomie au

niveau mondial ces dernières années, la place de la transplantation pulmonaire dans la prise en charge des patients HPPE a considérablement changé (D'Armini et al. 2016). Les cas les



plus sévères sont davantage susceptibles de subir une transplantation.

Figure 19 : Evolution du nombre de transplantations pulmonaires et d'endarterectomies entre 1994 et 2013. Issue de (D'Armini et al. 2016).

Chapitre III : Les modèles animaux pour

l'étude de l'HTP

De nombreux modèles animaux ont été développés pour améliorer les connaissances sur la physiopathologie de l'HTP. Les modèles d'HTP utilisés couramment sont décrits dans la première partie de ce chapitre. Dans une seconde partie, le modèle porcin d'HPPE utilisé au cours de cette thèse sera détaillé.

1. Modèles d'HTP

a. Monocrotaline

La **monocrotaline** (MCT) est un alcaloïde issu de la plante *Crotalaria spectabilis*. La métabolisation de la MCT dans le foie entraîne la formation de dérivés qui induisent une réaction inflammatoire importante concentrée dans les poumons. Deux à 3 semaines après l'injection sous-cutanée ou intrapéritonéale de MCT, l'état de l'animal (dans la majeure partie des cas il s'agit de rat) se détériore du fait d'un épaissement de la media des artères pulmonaires, de la muscularisation des artères et de la prolifération des cellules de l'adventice. Toutes ces modifications entraînent une augmentation de la PAPm et des résistances vasculaires pulmonaires, conduisant finalement à l'hypertrophie du VD (Figure 20). La pathologie ne s'établit pas progressivement mais plutôt de manière aiguë. Ce modèle ne reproduit pas l'HTP sévère observée chez les patients. Pour ce faire, l'administration de **MCT peut être combinée à une pneumonectomie**. L'association de ces deux actions engendre une hypertrophie du VD et des altérations hémodynamiques plus importantes (Santos-Ribeiro et al. 2016).

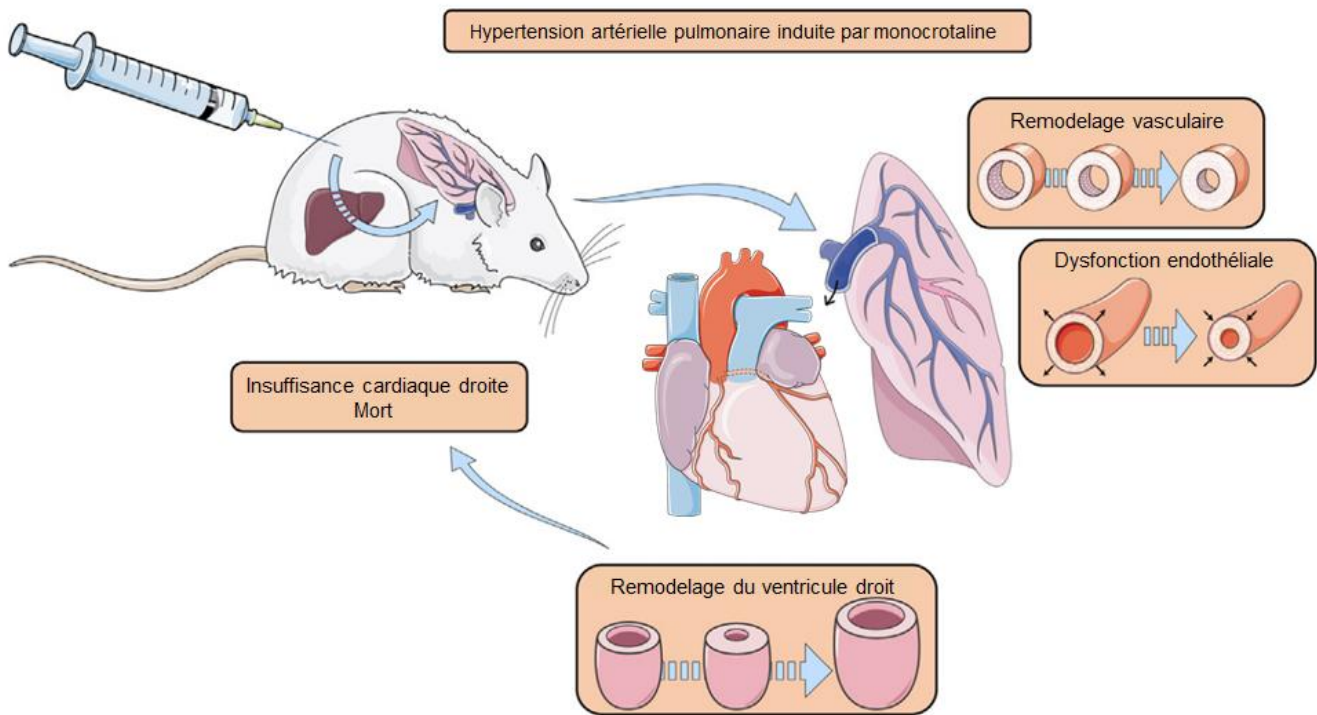


Figure 20 : Développement d'une HTP suite à l'injection de monocrotaline. Adaptée de (Santos-Ribeiro et al. 2016).

b. Hypoxie chronique

Le modèle d'**hypoxie chronique** (HC) est considéré comme étant représentatif du groupe 3 de la classification des HTP, qui correspond aux HTP secondaires à une pathologie pulmonaire et/ou une hypoxie. Pour mettre en place ce modèle, les animaux (rats ou souris) sont placés dans des caissons hypobariques pour reproduire l'hypoxie observée en altitude. Un remodelage au niveau de l'arbre vasculaire pulmonaire est observé avec une augmentation de l'épaisseur des artères, de l'inflammation et une augmentation de la PAPm. Cependant ce modèle ne reproduit pas l'HTP sévère observée chez l'homme et la réponse à l'hypoxie est variable entre les espèces.

Pour améliorer ce modèle, **l'HC a été combinée avec des injections de MCT**. Dans ce cas les rats ont développé une HTP caractérisée par un épaissement de l'intima, une prolifération des cellules endothéliales anormale et des lésions vasculaires pulmonaires associées à une insuffisance cardiaque droite.

Une autre amélioration de ce modèle a été mise en point en **associant l'HC à l'administration de SU-5416** (noté SuHx dans la littérature), un inhibiteur du VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2). Le VEGFR-2 favorise la survie des cellules

endothéliales, ainsi, son inhibition mène à l'apoptose des cellules endothéliales ce qui contribue au développement de l'HTP. Ce modèle combiné présente à la fois un remodelage vasculaire pulmonaire et une augmentation de l'hypertrophie du VD et de ses pressions systoliques (Maarman et al. 2013) (Stenmark et al. 2009).

c. Cerclage du tronc de l'artère pulmonaire

Pour réaliser un cerclage du tronc de l'artère pulmonaire (**PAB** dans la littérature pour « pulmonary arterial banding ») chez le rat, une thoracotomie gauche est réalisée et le tronc de l'artère pulmonaire est disséqué. Une aiguille de 18-gauge est placée le long de l'artère pulmonaire et une suture est réalisée autour de l'artère pulmonaire et de l'aiguille. L'aiguille est ensuite enlevée, la suture laissant ainsi une lumière de l'artère pulmonaire équivalente au diamètre de l'aiguille. Ainsi, plus l'animal grandit, plus la lumière se rétrécit, induisant une augmentation progressive de la post-charge du VD. Dans ce modèle il n'y a pas de remodelage vasculaire pulmonaire mais les rats développent une hypertrophie du VD (Maarman et al. 2013).

d. Modélisation chirurgicale

Chez l'homme, une HTAP idiopathique peut survenir suite à une malformation cardiaque congénitale telle qu'un shunt gauche-droit ou une tétralogie de Fallot. Ces malformations cardiaques peuvent être recréées chirurgicalement chez l'animal pour reproduire l'HTP : création d'un shunt entre le cœur droit et le cœur gauche, anastomose de l'artère sous-clavière sur le tronc artériel pulmonaire, élargissement de la voie d'évacuation du sang du VD vers les poumons, excision d'une valve pulmonaire... Ceci augmente le débit sanguin vers les poumons et donc les résistances vasculaires pulmonaires. Par conséquent, il apparaît un remodelage vasculaire pulmonaire qui entraîne à terme une dysfonction cardiaque droite (Maarman et al. 2013).

e. Autres modèles

De nombreux autres modèles ont été développés pour élargir les connaissances sur l'HTP. Tous ne seront pas décrits en détail ici car ils ne seront pas utiles pour comprendre la suite de ce projet de thèse. Voici tout de même quelques exemples. Etant donné qu'il est facile de

manipuler spécifiquement l'expression de certains gènes chez la souris, de nombreux modèles d'HTP ont été développés par des stratégies de knockout (KO) ou de surexpression génique : KO du gène Bone Morphogenic Protein Receptor 2 (BMPR2) dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, KO du récepteur à l'endothéline-B, surexpression poumon-spécifique de l'IL-6... La souche de rat Fawn-Hooded est sensible à l'hypoxie et développe une HTP légère en conditions normales et une HTP sévère lorsque les animaux sont soumis à l'hypoxie. L'induction de l'HTP chez la souris par un parasite, le schistosomiasis, est aussi couramment utilisée (Stenmark et al. 2009) (Maarman et al. 2013).

Les caractéristiques des principaux modèles utilisés ainsi que leurs avantages et inconvénients sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Différents modèles	Espèces	Caractéristiques histologiques	Avantages	Inconvénients
Monocrotaline (MCT)	Rat, chien, mouton	Hypertrophie de la media, muscularisation des artères non musculaires, inflammation vasculaire	HTP sévère, dysfonction du VD, modèle reproductible	Stimulus toxique, pas de lésions plexiformes
Hypoxie chronique (Hx)	Rat, souris	Hypertrophie de la media, muscularisation des artères non musculaires, inflammation vasculaire	Stimulus physiologique, hypertrophie du VD,	Pas d'obstruction des artères distales, HTP peu sévère, variabilité de la réponse selon les espèces, peu de preuves d'une dysfonction du VD
Hypoxie chronique + SU5416 (SuHx)	Rat	Hypertrophie de la media, muscularisation des artères non musculaires, formation de néo-intima, lésions plexiformes	Stimulus physiologique, prolifération des cellules endothéliales	Les modifications observées dans ce modèle ne corrélerent pas clairement avec un des groupes de la classification de l'HTP
Ligature de l'artère pulmonaire (PAB)	Rat, souris	Hypertrophie du VD, augmentation des pressions systoliques du VD	Modèle purement mécanique de surcharge de pression, dysfonction importante du VD	Manipulation difficile, pas de dysfonction de l'arbre vasculaire pulmonaire, ne reproduit pas toutes les modifications du VD observées chez l'homme

Tableau 2 : Récapitulatif des principaux modèles d'HTP utilisés. Adapté de (Santos-Ribeiro et al. 2016), (Stenmark et al. 2009), (Maarman et al. 2013).

2. Modèle porcin d'HPPE utilisé dans l'étude

Il existe quelques modèles gros animaux d'HTP, cependant, très peu reproduisent la majorité des caractéristiques de cette pathologie. Dans le laboratoire du Pr Mercier, un modèle porcin d'HPPE a été mis au point (Mercier et al. 2013). Ce modèle est le seul modèle gros animal qui se rapproche autant de l'HPPE humaine. Pour rappel, celle-ci correspond au groupe 4 de la classification des HTP. Le porc est un modèle préclinique intéressant car l'organisation et la taille de ses organes ainsi que sa physiologie sont très proches de celles de l'homme.

L'HPPE est induite chez des porcs mâles de race White Large, sevrés et pesant 20-25 kg. Pour ce faire, dans un premier temps, l'artère pulmonaire gauche est ligaturée via une thoracotomie gauche. Par la suite, des embolisations hebdomadaires du lobe inférieur droit par de l'Histoacryl® sont réalisées pendant 5 semaines (Figure 21). L'Histoacryl® est une

colle tissulaire se solidifiant au contact de liquide physiologique ; il se fige au contact du sang et adhère aux parois artérielles. La quantité de colle administrée était limitée par les valeurs de pression systémique (inférieure à 60 mmHg), de saturation d'oxygène (inférieure à 90%) et de débit cardiaque (inférieur à 2L/min).

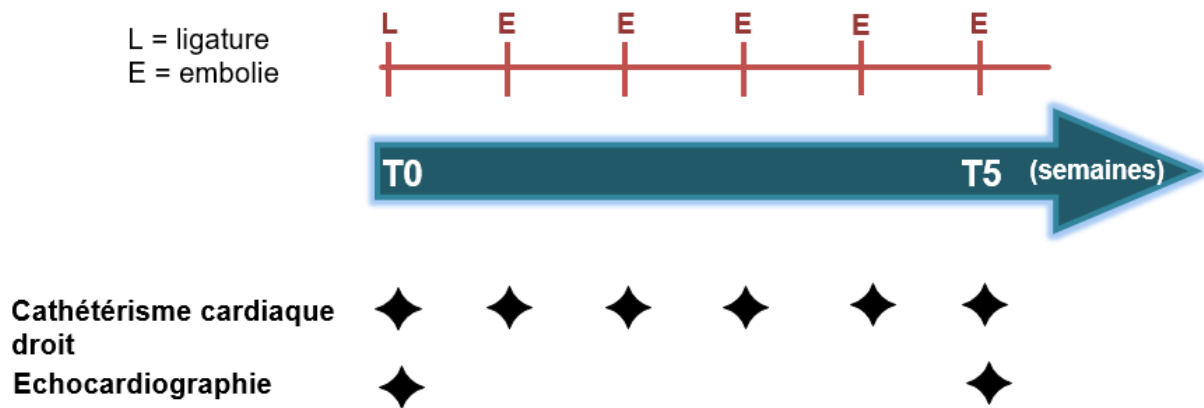


Figure 21 : Plan expérimental de l'induction de l'HPPE chez le porc. Dans un premier temps, il y a une ligature de l'artère pulmonaire gauche puis des embolisations répétées du lobe inférieur droit. Pour étudier l'évolution de la pathologie, une échocardiographie à T0 et à T5 (semaines) est réalisée ainsi qu'un cathétérisme du VD pour suivre l'évolution des pressions pulmonaires.

La ligature de l'artère pulmonaire va surcharger la circulation pulmonaire. Les embolisations répétées permettent d'induire une obstruction progressive du réseau pulmonaire et donc un remodelage progressif du VD face à l'augmentation de la pression, évitant ainsi la mort par insuffisance cardiaque droite aiguë. La combinaison de ces 2 manipulations induit donc un shunt complet du poumon gauche du système pulmonaire et l'obstruction des artères proximales du lobe inférieur droit par du matériel thrombotique. Ainsi, les artères du lobe supérieur droit restent fonctionnelles, mais présentent des lésions similaires à celles observées dans les territoires non obstrués des patients HPPE. Après 5 semaines, ce modèle porcin reproduit toutes les caractéristiques de l'HPPE chez l'homme (**Figure 22**) : une augmentation de l'épaisseur de la média des artères pulmonaires distales dans les territoires obstrués et non obstrués, une augmentation de l'apport sanguin systémique vers les artères bronchiques dans les territoires obstrués entraînant une hypertrophie de la circulation bronchique, une hypertrophie et un élargissement du VD ainsi qu'un déplacement du septum interventriculaire vers le VG.

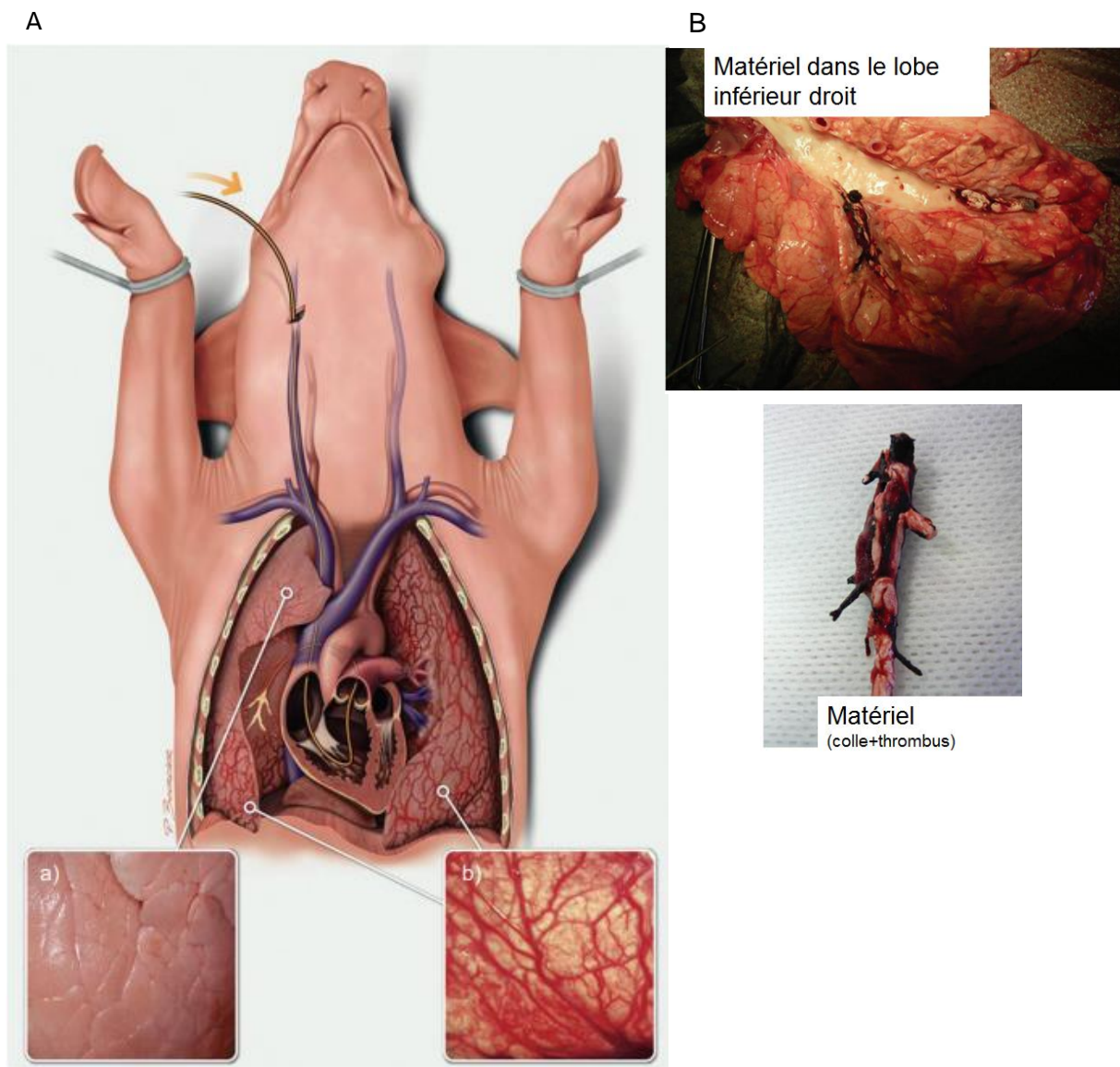


Figure 22 : Caractéristiques du modèle porcin d'HPPE. A : Modèle porcin d'HPPE avec en (a) le lobe supérieur droit non obstrué et en (b) l'hypertrophie des artères bronchiques dans les territoires obstrués du poumon gauche et du lobe inférieur droit. B : Matériel thrombotique retrouvé dans la partie distale du lobe inférieur droit, composé de colle et de thrombus. Issue de (Mercier et Fadel 2013) et (Mercier et al. 2013).

L'hémodynamique est aussi altérée, avec une augmentation de la PAPm (supérieure à 25 mmHg) et des résistances pulmonaires totales (RPT) (Mercier et Fadel 2013). Le couplage ventriculo-artériel est lié au remodelage du VD dans ce modèle (Guihaire et al. 2014). Une surexpression de l'ET et de ses récepteurs a aussi été observée dans les artères pulmonaires des territoires non obstrués. Cependant, ce modèle ne reproduit pas l'origine de

l'HPPE, car il n'y a pas d'altération de la résolution du thrombus comme chez l'homme. Cependant, il reproduit les conséquences d'une obstruction vasculaire pulmonaire chronique. En effet ce modèle reconstitue l'interaction entre le système vasculaire pulmonaire lésé et le VD (Noly et al. 2015). Toutes les modifications morphologiques, fonctionnelles et biologiques observées dans le VD humain sont répliquées. Une augmentation de la surface des cardiomyocytes, de la fibrose et une inadéquation entre la densité capillaire et le travail demandé au VD pour éjecter le sang vers les poumons sont constatées dans ce modèle (Noly et al. 2017).

C'est dans ce modèle porcin d'HPPE que la thérapie cellulaire a été administrée au cours de cette thèse.

D'autres modèles d'HTP sur gros animaux, préférentiellement porc ou chien, ont été mis au point. L'administration intrapéritonéale de MCT chez des porcs miniatures du Tibet engendre une augmentation de la PAPm, un remodelage du système vasculaire pulmonaire et une hypertrophie du VD (Zeng et al. 2013). L'administration hebdomadaire ou journalière de microbilles (composées de céramique ou de polysaccharides) dans la circulation pulmonaire permet aussi d'observer un remodelage vasculaire pulmonaire et une hypertrophie du VD (Sato et al. 2008) (Rothman et al. 2017). Des modèles chirurgicaux de shunt gauche-droit (Rothman et al. 2017) ou de ligature du retour veineux pulmonaire (Aguero et al. 2014) présentent des modifications similaires.

Chapitre IV : Zoom sur le ventricule droit dans l'HTP

Le VD a longtemps été considéré comme une chambre cardiaque accessoire. Il a donc été peu étudié par rapport à son rôle capital dans de nombreuses pathologies cardiaques et pulmonaires. Dans le cas de l'HTP, c'est sa fonction qui va conditionner la survie des patients. L'objectif de ce chapitre est de présenter en détail le VD et sa fonction, et ainsi mieux comprendre la défaillance ventriculaire droite observée en HTP.

I. Généralités sur l'insuffisance cardiaque droite en HTP

1. Particularités et anatomie du ventricule droit

a. Origine embryonnaire

Plusieurs caractéristiques embryologiques et anatomiques distinguent le ventricule droit du gauche. Durant l'embryogénèse, l'embryon s'organise en 3 feuillets : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Le cœur se forme à partir du mésoderme qui va produire les muscles, le squelette et les vaisseaux sanguins. Au sein de ce mésoderme, le VD est issu du champ cardiaque secondaire tandis que le VG est issu du champ cardiaque primaire. A partir de la 3^{ème} semaine du développement embryonnaire, un tube cardiaque primitif commence à battre puis un ventricule et une oreillette se distinguent. A la fin de la 4^{ème} semaine, un septum se forme, ce sont les premières étapes de la création de 2 ventricules distincts. A la fin de la 8^{ème} semaine deux circulations se différencient, les circulations systémique et pulmonaire. Au cours de la suite du développement fœtal, le VD fournit environ 60% du débit cardiaque total et assure la circulation systémique via le canal artériel et le foramen ovale. A la naissance, ces 2 structures se referment et le VG devient le principal ventricule à assurer la circulation systémique, tandis que le VD s'adapte pour éjecter le sang vers la circulation pulmonaire ([Figure 23](#)) (Konstam et al. 2018).

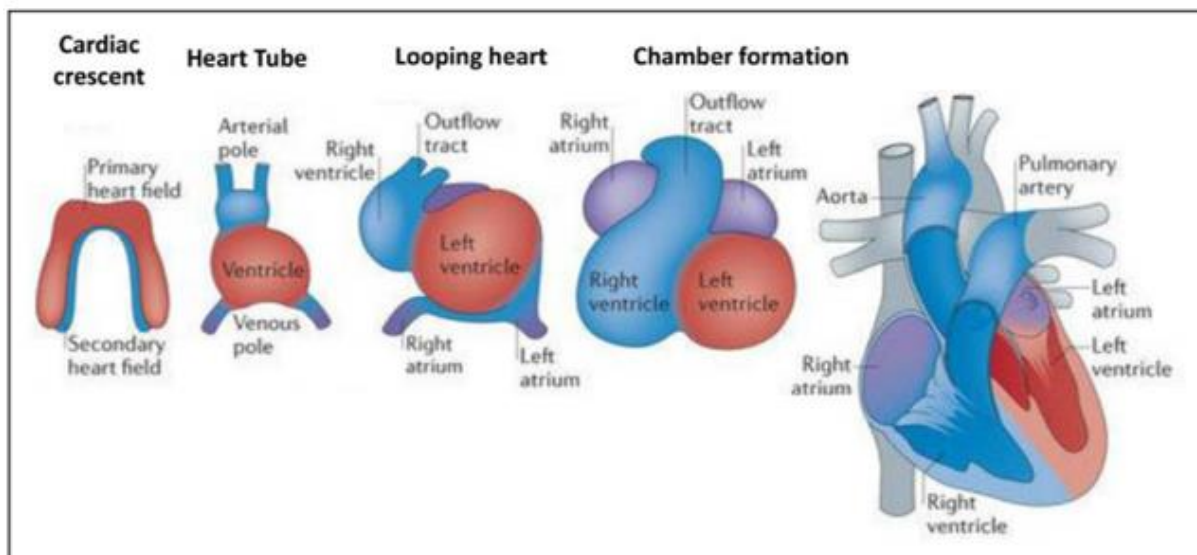


Figure 23 : Développement embryonnaire du cœur. Issue de (Konstam et al. 2018).

b. Morphologie

Comparé au VG, le VD est fin (2-5 mm) et compliant. Il correspond à 1/6 de la masse musculaire du VG. Sa forme est complexe, en croissant, il s'enroule autour du VG ellipsoïde au niveau du septum (Figure 24 A). Il y a une forte interaction et interdépendance entre les deux ventricules car ils partagent ce septum interventriculaire. La position du septum va conditionner la forme du VD (Haddad et al. 2008). Normalement, il se courbe vers le VD, lui donnant ainsi sa forme de croissant. Quand il est exposé de manière chronique à une augmentation de post-charge, le VD s'adapte en s'hypertrophiant et en se dilatant. En effet, d'après la loi de Laplace, l'augmentation de la pression sur la paroi du ventricule peut être modérée par l'augmentation de l'épaisseur de cette paroi (Harrison, Hatton, et Ryan 2015). Dans ce cas, le septum se déplace vers le VG et affecte son remplissage (Figure 24 B). Environ 1/3 du travail systolique du VD est effectué par la contraction du septum (Brittain et al. 2012).

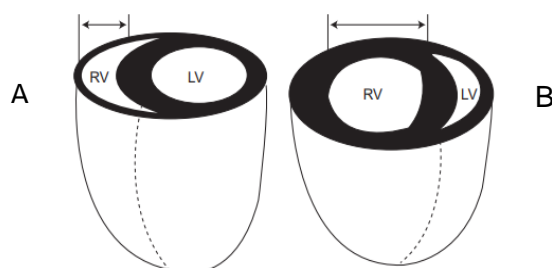


Figure 24 : Morphologie du VD et VG. A : à l'état normal, B : dans le cas de l'HTP, le VD est hypertrophié et dilaté, ses modifications forcent le septum à se courber vers le VG. Issue de (Brittain et al. 2012).

Trois chambres distinctes peuvent être décrites dans le VD : le **sinus**, ou l'entrée, composé de la valve tricuspide, des muscle papillaires et des cordons d'ancrage tendineux ; le **myocarde apical trabéculé** ; et l'**infundibulum** (Haddad et al. 2008) (Guihaire et al. 2015).

c. Fonction et caractéristiques du VD

La fonction du VD est de pomper le sang désoxygéné vers le réseau artériel pulmonaire afin qu'il soit ré-oxygéné (Figure 25).

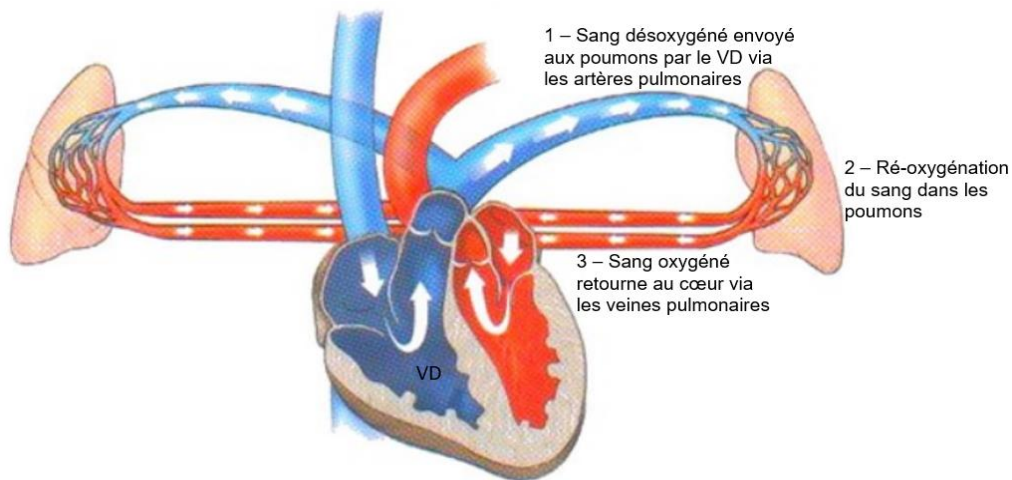


Figure 25 : Système cardio-pulmonaire qui image le rôle du VD. Adaptée de <https://nataswim.info>.

La contraction du VD est séquentielle, débutant par la contraction du sinus et du myocarde trabéculé et se terminant par celle de l'infundibulum (Haddad et al. 2008). Sa contraction est plus longitudinale que radiale et s'effectue dans un mouvement de torsion (Tadic 2015). Le VD génère le même volume d'éjection systolique que le VG. Cependant, son travail systolique est moindre en comparaison au VG car le système vasculaire pulmonaire présente une résistance plus basse et est plus compliant que la circulation systémique (Harrison, Hatton, et Ryan 2015).

De par sa fonction, le VD est exposé aux changements fréquents du volume de retour veineux, lui-même influencé par les variations de la respiration, la position du corps et de la condition pathologique (Guihaire et al. 2015). Le VD tolère beaucoup mieux une surcharge de volume que de pression. En effet, une surcharge de volume isolée, due à un défaut auriculaire par exemple, peut être présente pendant de nombreuses années sans que la fonction du VD ne soit altérée de manière notable. **Le VD est beaucoup plus sensible à**

une augmentation de la pression que du volume. Dans le cas d'une HTP, l'obstruction de l'arbre vasculaire pulmonaire induit une augmentation de la pression pulmonaire et donc de la post-charge du VD. Pour faire face à ces modifications et répondre aux besoins du corps en oxygène, le VD se dilate grâce à la finesse de sa paroi, et peut ainsi éjecter le même volume de sang vers les poumons (Brittain et al. 2012).

La plasticité du VD lui permet de récupérer une forme et une fonction relativement normales suite à une transplantation pulmonaire (Gorter et al. 2017) ou à une endartériectomie (Rolf et al. 2014). En effet, le VD étant fortement affecté par la post-charge qu'il subit, une fois celle-ci revenue à la normale grâce au retrait du matériel thrombotique ou du poumon défectueux, plus rien ne l'empêche d'éjecter le sang vers le système pulmonaire. Il retrouve donc une forme et une fonction normales.

2. Le ventricule droit en HTP

a. Le ventricule droit, un point clé de la survie des patients HTP

La fonction du VD conditionne fortement la survie des patients atteints d'HTP. L'étude de Ghio et al. a révélé que les patients avec une PAPm élevée et une fraction d'éjection du VD préservée avaient un bien meilleur taux de survie que ceux présentant une PAPm élevée et une fraction d'éjection altérée (Figure 26) (Ghio et al. 2001). Cette étude a permis de réaliser l'importance de l'évaluation de la fonction cardiaque droite dans le diagnostic et la prise en charge de la pathologie.

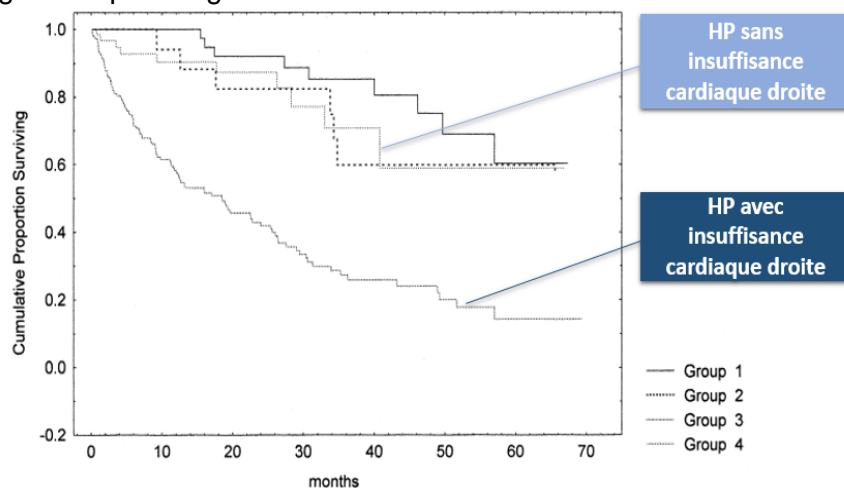


Figure 26 : Etude de la survie des patients atteints d'HTP avec ou sans insuffisance cardiaque droite associée. Adaptée de (Ghio et al. 2001).

De plus, une autre étude montre l'importance du stade de dysfonction cardiaque droite pour les patients atteints d'HTP. Le but était d'évaluer les améliorations cliniques de patients HTP recevant comme thérapie des vasodilatateurs spécifiques, et de faire ressortir des prédicteurs de la survie de ces patients. Après 14 mois d'étude, il a été observé que l'amélioration clinique des patients était dépendante de l'état morphologique et fonctionnel du VD avant le traitement (Giusca et al. 2013). L'état de dysfonction du VD conditionne fortement la réponse des patients aux traitements et donc leur survie.

C'est dans l'objectif de prolonger la survie des patients que nous avons décidé de cibler le VD et de mettre au point une thérapie permettant de le soutenir afin qu'il ne devienne pas de plus en plus défaillant.

b. Détail du diagnostic de l'insuffisance cardiaque droite en HTP

Le VD étant un point clé de la survie des patients, il est important de bien mesurer son état de dysfonction. Pour ce faire, différentes techniques sont utilisées.

La méthode non invasive couramment utilisée est l'**échocardiographie**. Réaliser une évaluation par échographie du VD n'est pas évident car sa forme en croissant et ses trabéculations rendent difficile une estimation du volume, surtout en échographie 2D. Cependant, l'échographie 3D, qui s'est développée ces dernières années, permet d'examiner de manière plus précise la fonction du VD. Plusieurs paramètres échographiques permettent de prédire le pronostic des patients HTP (Tadic 2015) (Ryan et al. 2015) (Harrison, Hatton, et Ryan 2015) (Ryan et Tedford 2015) :

- l'hypertrophie du VD, définie par une épaisseur de la paroi libre en fin de diastole supérieure à 5 mm, reflétant une augmentation de la masse du VD,
- la dilatation du VD, qui est mesurée en vue 4 cavités,
- la surcharge de pression du VD,

- le *RVFAC* mesuré en vue 4 cavités, qui est défini par : (l'aire du VD en diastole - l'aire du VD en systole)/ l'aire du VD en diastole, exprimé en pourcentage. Un *RVFAC* inférieur à 35% indique une dysfonction,
- le mouvement de l'anneau de la valve tricuspide (*TAPSE*), utilisé pour apprécier la contraction longitudinale du VD, une valeur inférieure à 18 mm prédit une augmentation du risque de mortalité, sa mesure est dépendante de la pré-charge et post-charge,
- la fraction d'éjection du VD (*RV strain*) qui est déduite de la mesure précédente.

L'utilisation de l'échographie Doppler permet d'avoir des informations la fonction du VD par région (van de Veerdonk et al. 2014).

L'**IRM** constitue la technique de référence pour mesurer la taille, la fonction, le débit et la masse du VD. L'évaluation du VD par IRM est reproductible et plus précise que par l'échographie car elle permet de détecter des modifications moindres (Thenappan et al. 2018). L'IRM permet de mesurer le volume systolique du VD ainsi que sa fraction d'éjection, paramètres les plus communément utilisés pour évaluer la fonction systolique du VD (van de Veerdonk et al. 2014). L'IRM peut aussi donner une information sur le degré de fibrose du VD en mesurant la rétention du gadolinium injecté dans l'artère coronaire droite (Ryan et al. 2015).

Le **cathétérisme cardiaque droit** demeure nécessaire pour établir de manière définitive le diagnostic de l'HTP et effectuer le suivi de la dysfonction ventriculaire droite. Il permet de mesurer la PAPm, le débit cardiaque et la pression capillaire pulmonaire (Ryan et al. 2015).

Bien que tous les paramètres cités précédemment soit utiles, ils sont dépendants des conditions de charges du VD et donc ne permettent pas de caractériser la fonction intrinsèque du VD. Le ratio E_{es}/E_a représente l'efficacité du **couplage ventriculo-artériel** et est indépendant des conditions de charge du VD (van de Veerdonk et al. 2014). L'élastance en fin de systole du VD (E_{es}) est une mesure de la contractilité intrinsèque du myocarde. E_a

correspond à l'élastance pulmonaire. En d'autres termes, E_{es}/E_a correspond au rapport entre la puissance de contraction du ventricule et la capacité du réseau pulmonaire à recevoir le flux sanguin. Si ce rapport est inférieur à 1, on parle de découplage, c'est-à-dire que le cœur fournit beaucoup plus de travail pour amener le flux sanguin aux poumons. S'il est égal à 1 le couplage ventriculo-artériel est équilibré. La détermination de ces deux paramètres requiert la mesure de nombreuses boucles pression-volumes qui s'effectuent par une intervention invasive. L'approche classique nécessite l'occlusion de la veine cave, requérant une certaine technique et posant un problème éthique pour les patients. Son utilisation est donc très limitée en clinique (Naeije et Manes 2014).

c. Deux états du VD en HTP : adapté et désadapté

Comme évoqué dans les chapitres précédents, l'HTP est une pathologie qui se développe progressivement et affecte dans un premier temps le lit vasculaire pulmonaire puis le VD. Celui-ci fait face à une surcharge de pression pulmonaire due à l'obstruction des vaisseaux. Par conséquent, la post-charge augmente. En d'autres termes, la force que doit vaincre le VD pour éjecter le sang vers le système respiratoire augmente. Afin d'éjecter le sang avec plus de force, il va s'adapter et se modifier. Dans les premiers temps de la pathologie, le VD peut compenser l'augmentation de la post-charge mais la pathologie étant chronique, si rien n'est entrepris, une insuffisance ventriculaire droite se développe. Le VD est alors pris dans un **cercle vicieux** (Figure 27) : il se remodèle et sa fonction est altérée, s'ensuivent une ischémie, une altération de son métabolisme, de l'angiogenèse et un remodelage adrénergique. Les vaisseaux pulmonaires étant toujours obstrués, les remodelages observés se poursuivent jusqu'au décès du patient par insuffisance cardiaque droite si aucun traitement n'est mis en place ou n'est efficace (Ryan et Archer 2014) (Ryan et al. 2015) (Vonk-Noordegraaf et al. 2013).

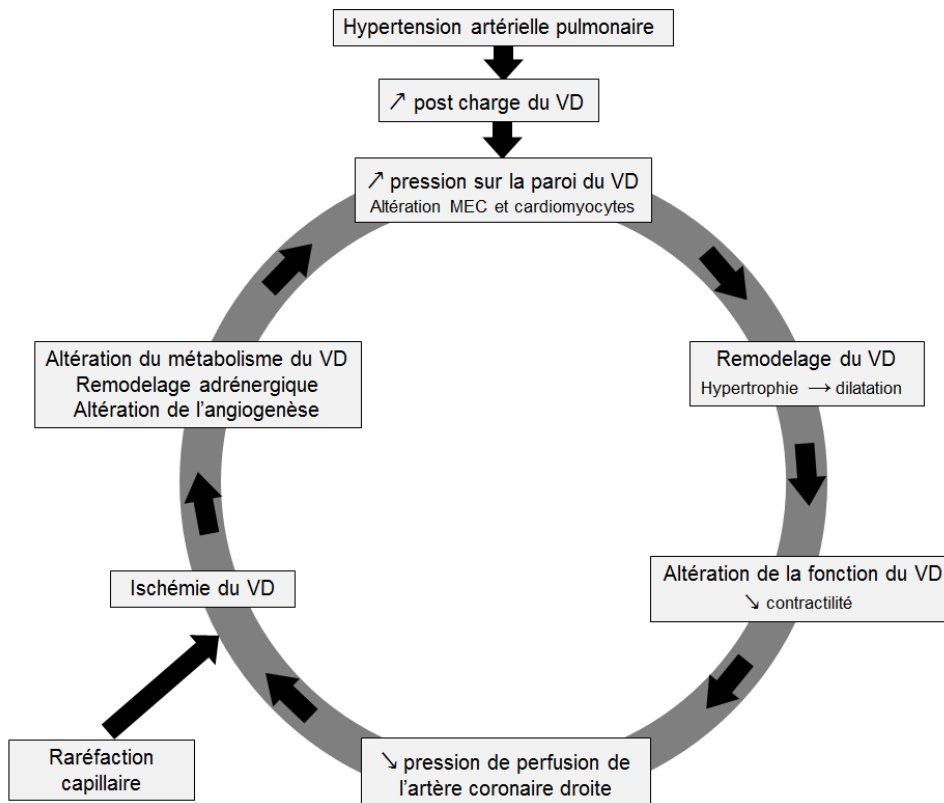


Figure 27 : Cercle vicieux dans lequel est pris le VD en HTP. Adaptée de (Loisel, Provost, Haddad, et al. 2018).

Parmi les patients présentant un remodelage hypertrophique du VD, certains vont rapidement décompenser et s'aggraver tandis que d'autres vont rester stables pendant des années malgré une élévation de pression et un niveau d'hypertrophie similaires (Ryan et Archer 2014). On distingue donc deux états du VD : **un état adapté et un état désadapté**. Les facteurs déterminants influençant la transition entre ces deux états sont encore mal connus mais plusieurs mécanismes correspondant à l'état désadapté ont tout de même été identifiés (Figure 28) (Asosingh et Erzurum 2018).

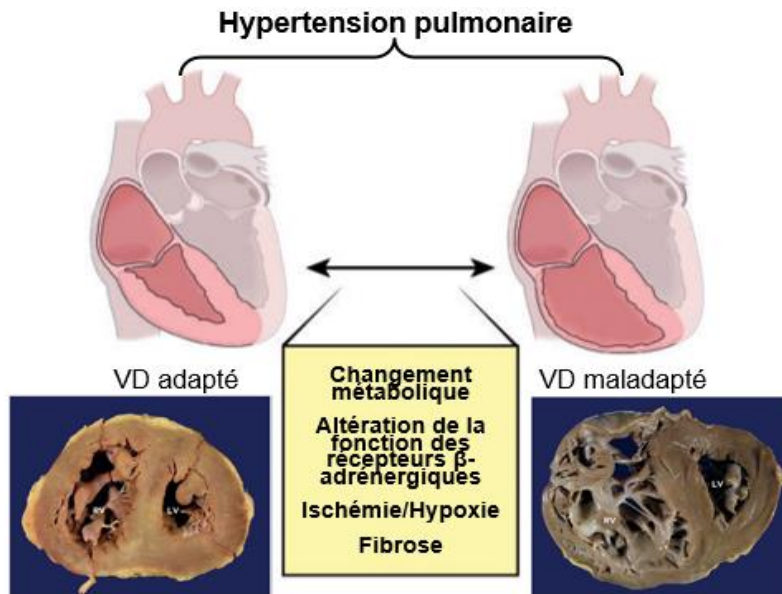


Figure 28 : Transition de l'état adapté vers l'état désadapté du VD en HTP. Adaptée de (Asosingh et Erzurum 2018) et (Ryan et Archer 2014).

L'état **désadapté** est caractérisé par une capacité physique réduite, une diminution du débit cardiaque et de la fraction d'éjection du VD. De plus, le VD présente de la fibrose et est dilaté (Ryan et al. 2015). Bien que ces définitions semblent peu précises, plusieurs anomalies au niveau cellulaire et moléculaire sont communes à l'état désadapté. Ainsi l'ischémie du VD, un métabolisme caractérisé par une glycolyse aérobie, une altération de l'angiogenèse, une raréfaction capillaire et une dérégulation du système nerveux autonome font partie des caractéristiques d'un état désadapté. De plus, ces modifications s'étendraient aussi au VG, tandis qu'à l'état adapté seul le VD est affecté (Ryan et Archer 2014) .

Au contraire, l'état **adapté** est défini par une hypertrophie concentrique du VD qui est peu dilaté et peu fibreux. La capacité d'exercice est préservée, ainsi que le débit cardiaque et la fraction d'éjection du VD (Ryan et al. 2015).

	Ventricule droit adapté	Ventricule droit désadapté
Survie	Bonne survie	Mortalité importante
Remodelage du VD		
Taille	Normale, légère dilatation	Dilatation
Ratio poids/volume	Elevé	Bas
Hypertrophie	Concentrique	
Fonction		
Couplage ventriculo artériel	Préservé ou légèrement diminué	Diminué
Fraction d'éjection	Normale à légèrement diminuée	Diminuée
Débit cardiaque	Préservé	Diminué
Angiogenèse	Augmentée, HIF1 α activé, augmentation de l'expression de VEGF et SDF1	Diminuée, HIF1 α inhibé, raréfaction capillaire
Fibrose	Minime	Importante
Stress oxydant	Faible production de ROS	Augmentation de la production de ROS
Métabolisme	Augmentation de l'expression de GLUT1 qui favorise l'augmentation de l'assimilation du glucose	Diminution de l'assimilation du glucose, glycolyse aérobie, glutaminolyse
Signalisation adrénergique		Altérée, désensibilisation et découplage des récepteurs β -adrénergiques et des récepteurs α et β dopaminergiques

Tableau 3 : Résumé des différentes caractéristiques des états adapté et désadapté du VD en HTP.

Afin de mieux comprendre la dysfonction du VD et l'objectif de ce travail de thèse, les différents mécanismes sont décrits en détail dans la partie suivante.

II. Détail des modifications affectant le ventricule droit en HTP

1. Ischémie du ventricule droit

L'ischémie du VD a été révélée chez les patients HTP par différentes techniques. L'imagerie de perfusion nucléaire a montré une diminution de la perfusion du VD chez des patients HTP après un effort physique (Gómez et al. 2001). L'observation du VD en IRM suite à un stress induit par l'adénosine a aussi montré une diminution de la perfusion du VD directement corrélée à la PAPm et à la dysfonction du VD (Vogel-Claussen et al. 2011) (Figure 29).

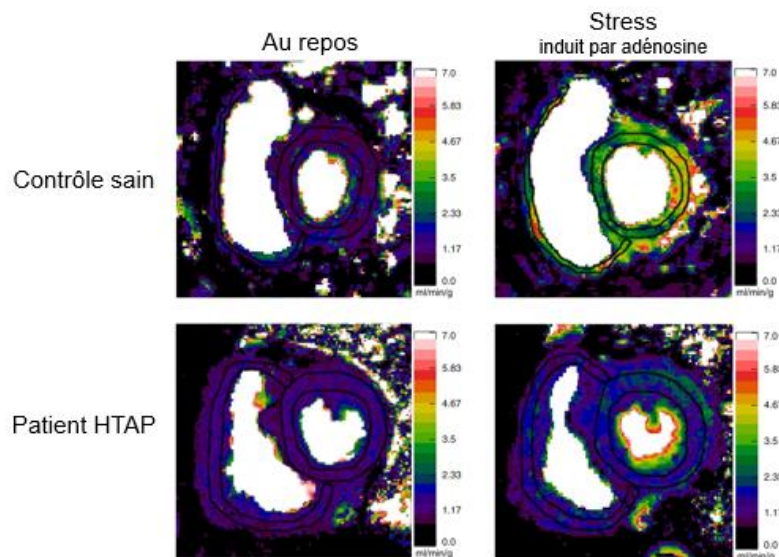


Figure 29 : Imagerie IRM du VD, chez un contrôle sain et un patient atteint d'HTAP, au repos et suite à un stress induit par l'adénosine. Il y a une diminution de la perfusion et un remodelage du VD chez le patient HTAP par rapport au contrôle. Adaptée de (Vogel-Claussen et al. 2011).

Chez les individus sains, la basse pression systolique du VD permet le remplissage de l'artère coronaire droite en diastole et en systole. En HTP, pour faire face à la surcharge de pression, le VD s'hypertrophie. Ceci entraîne une augmentation de la tension sur sa paroi, comprimant la circulation coronaire. Par conséquent la pression de perfusion de l'artère coronaire droite est diminuée et le VD est moins bien irrigué. Il a été observé que le flux de l'artère coronaire droite est diminué en systole et que cette diminution est liée à la pression systolique du VD et à sa masse (van Wolferen et al. 2008). Cette **réduction du flux coronaire** droit affecte fortement le fonctionnement du VD (Vogel-Claussen et al. 2011).

L'altération de la circulation coronaire n'est pas la seule cause entraînant l'ischémie du VD. Une **diminution de la densité capillaire** a été observée chez un modèle murin d'HTP (SuHx). Cependant, le modèle de dysfonction du VD induit par bandage de l'artère pulmonaire (PAB) n'a pas montré de diminution de la densité capillaire du VD alors que ces 2 modèles présentaient une élévation de la pression systolique du VD et une hypertrophie similaires (Figure 30). Ces observations suggèrent que l'ischémie du VD ne peut être expliquée uniquement par la surcharge de pression et par la diminution de la pression de perfusion de l'artère coronaire droite qui s'ensuit. Dans le modèle SuHx, Boogard et al. ont observé une diminution de l'expression du VEGF qui semble être due à un découplage entre Hypoxia Inducible Factor (HIF)1- α et le VEGF. Dans le VD dysfonctionnel, une augmentation du stress oxydatif peut mener à une altération de l'élément du promoteur du gène VEGF répondant à l'hypoxie. Le gène est donc moins sensible à la régulation par HIF1- α et l'expression protéique du VEGF est diminuée (Bogaard et al. 2009). Un rôle du micro-ARN (miR)-126 dans l'angiogenèse du VD en HTP a été identifié. L'expression de ce miR est diminuée dans le VD désadapté de patients HTP et il semblerait que cette régulation à la baisse altère l'angiogenèse en touchant la voie de signalisation du VEGF (Potus et al. 2015).

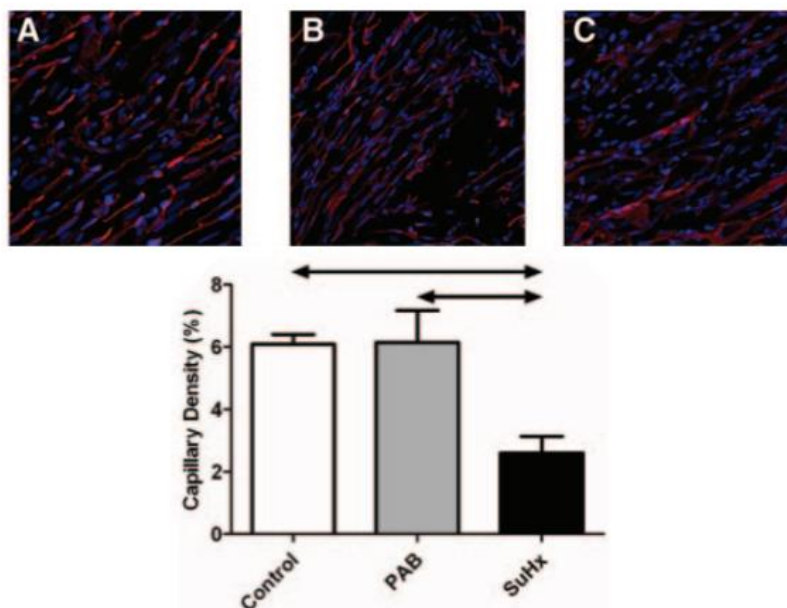


Figure 30: Densité capillaire du VD dans les modèles murins d'HTP. Image confocale des microvaisseaux du VD marqués par la lectine, les capillaires sont moins abondants dans le modèle SuHx tandis que la densité capillaire est similaire entre le groupe contrôle et le modèle PAB. Issue de (Bogaard et al. 2009).

Sutendra et al. ont étudié l'angiogenèse au cours de la transition du VD d'un état adapté à un état désadapté. Le modèle de rat MCT a été utilisé et les animaux ont été séparés en 2 groupes : adapté (3 à 4 semaines après injection de MCT) ou désadapté (5 à 6 semaines après injection de MCT). Les animaux désadaptés correspondent à ceux présentant une diminution de la pression systolique et du débit cardiaque ainsi que des signes cliniques d'insuffisance cardiaque. Il a été observé une diminution du stress oxydatif et une augmentation de l'activité de HIF1- α chez les animaux adaptés, contrairement aux désadaptés. Seuls les animaux désadaptés présentaient une diminution de la densité capillaire (Figure 31) (Sutendra et al. 2013). L'étude d'un modèle murin d'HTP (HC) a montré des résultats similaires. Dans les premiers temps de la modélisation, il y a une activité angiogénique associée à un remodelage adaptatif du VD. Ensuite, l'exposition continue à l'hypoxie mène à un remodelage hypertrophique du VD sans que l'angiogenèse ne soit poursuivie (Kolb et al. 2015). Il semblerait donc que **la diminution de l'angiogenèse du VD marque la transition entre les 2 états.**

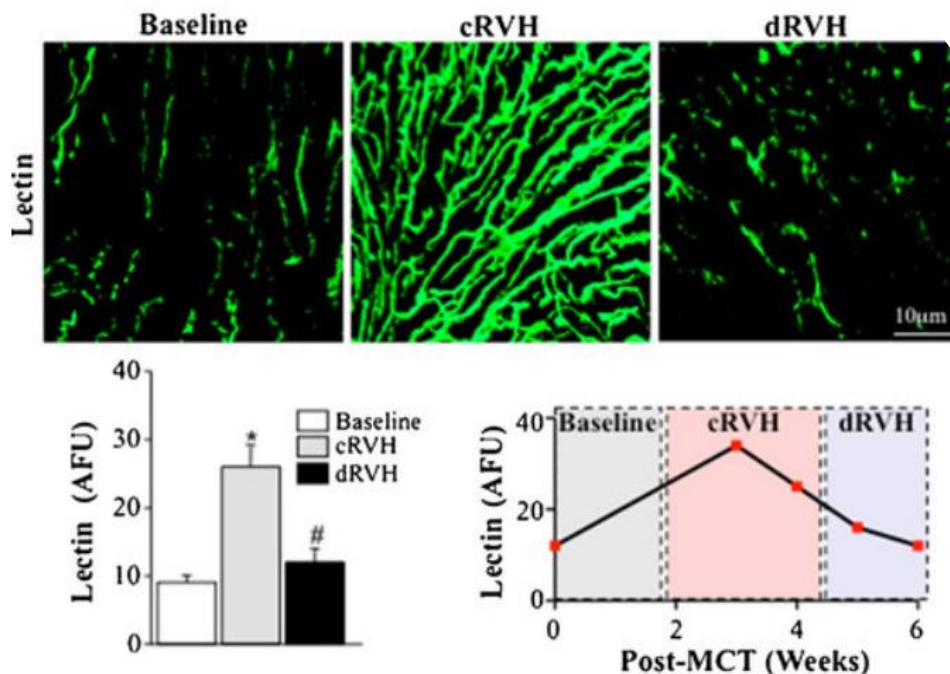


Figure 31 : Densité capillaire du VD à l'état adapté et désadapté. L'injection de lectine fluorescente en intraveineuse avant le sacrifice permet le marquage de l'endothélium des vaisseaux perfusés. La densité capillaire est augmentée dans le VD des animaux désadaptés (dRVH pour decompensated Right Ventricular Hypertrophy) par rapport aux adaptés (cRVH pour compensated RVH). Issue de (Sutendra et al. 2013).

La densité capillaire du VD de patients décédés d'insuffisance cardiaque droite due à une HTP a aussi été étudiée. Dans ce cas, les contrôles sont des patients décédés d'infarctus du myocarde. Une diminution de la densité capillaire a été observée uniquement dans le VD des patients décédés d'insuffisance cardiaque droite (Figure 32) (Gerrina Ruiter et al. 2013).

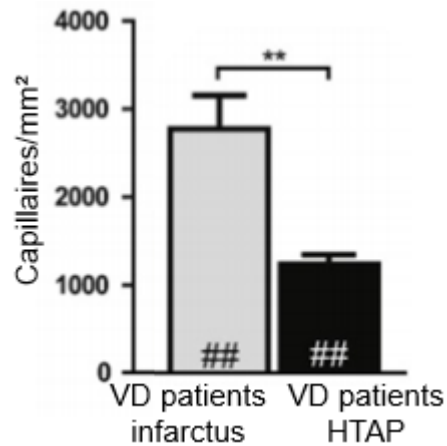


Figure 32 : Densité capillaire du VD de patients. Diminution significative de la densité capillaire (mesurée par un marquage von Willebrand) chez les patients décédés d'HTP par rapport à ceux décédés d'infarctus du myocarde. Adaptée de (Gerrina Ruiter et al. 2013).

L'angiogenèse étant déficiente, il n'y a pas de formation de nouveaux capillaires pour alimenter les cardiomyocytes qui s'hypertrophient en réponse à la surcharge de pression. On parle de **décalage entre l'angiogenèse et l'hypertrophie** (Crystal et Pagel 2018). De plus, les cardiomyocytes étant hypertrophiés, la distance de diffusion de l'oxygène entre le capillaire et la cellule est augmentée. Par conséquent, par rapport à la masse musculaire du VD, la densité capillaire est réduite en HTP (Gerrina Ruiter et al. 2013).

L'ischémie du VD, caractérisée par une mauvaise irrigation du muscle par l'artère coronaire droite et une raréfaction capillaire, contribue fortement à l'insuffisance cardiaque droite en HTP. Il est probable que l'ischémie précipite les changements métaboliques qui se produisent dans le VD. Des thérapies ciblant l'ischémie du VD pourraient être bénéfiques pour les patients et éviter ou retarder le passage du VD vers un état désadapté.

2. Métabolisme du ventricule droit

A l'état fœtal, la production d'Adenosine Triphosphate (ATP) se fait majoritairement via la glycolyse et l'oxydation du glucose. Après la naissance, l'**oxydation mitochondriale des**

acides gras est la principale source d'énergie (60-90%) et le **métabolisme du glucose** contribue aussi en partie à la production d'ATP (10-40%) (Ryan et Archer 2015) (Ryan et Archer 2014).

Dans des conditions normales, le métabolisme du glucose débute par la **glycolyse** qui convertit le glucose en pyruvate dans le cytosol. La glycolyse est couplée à l'**oxydation du glucose** se traduisant par le transport du pyruvate vers la mitochondrie où il sert de substrat pour la pyruvate dehydrogenase (PDH) qui va le convertir en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs et fournit des donneurs d'électrons pour la génération d'ATP (Ryan et Archer 2015). En condition pathologique, où la PDH est inhibée, la glycolyse est découplée de l'oxydation du glucose. Par conséquent, le pyruvate reste dans le cytosol où il va être transformé en lactate, c'est la glycolyse aérobie. La glycolyse aérobie constitue souvent le reflet de l'inhibition de la PDH par la kinase pyruvate dehydrogenase (PDK) (Ryan et Archer 2015).

Une autre voie métabolique utilisée pour la production d'énergie est la **glutaminolyse**. Elle correspond à l'hydrolyse de la glutamine en glutamate qui est ensuite convertie en α -ketoglutarate dans la mitochondrie. L' α -ketoglutarate entre dans le cycle de Krebs et permet la production d'énergie pour supporter la croissance cellulaire.

Les voies du métabolisme du glucose et de l'oxydation des acides gras sont liées, ainsi que celle de la glutaminolyse et de l'oxydation du glucose. La régulation à la baisse de l'une entrainera une augmentation de l'activité de l'autre.

En HTP, le VD subit de nombreux changements métaboliques. Il est davantage dépendant de la glycolyse, qui se découple de l'oxydation du glucose, ce qui induit la formation de pyruvate qui reste dans le cytosol. La **glycolyse aérobie** devient la principale voie métabolique pour produire l'énergie (Asosingh et Erzurum 2018). Cette glycolyse découplée produit beaucoup moins d'énergie que la glycolyse couplée à l'oxydation du glucose. Pour pallier à ce métabolisme inefficace, l'**absorption de glucose par les cardiomyocytes est**

augmentée. Ceci peut être quantifié par PET scan en mesurant l'absorption du ^{18}F FDG, un analogue du glucose. L'augmentation de l'absorption du ^{18}F fluorodésoxyglucose (FDG) a été démontrée dans le VD de patients HTP et corrèle avec son degré de dysfonctionnement (Figure 33). Cette augmentation de l'absorption du glucose est réversible chez les patients pour qui la thérapie prescrite est efficace (Oikawa et al. 2005) (Lundgrin et al. 2013). Il semblerait que le changement de métabolisme soit dû à la régulation à la hausse de PDK (Piao et al. 2010) (Rich et al. 2010).

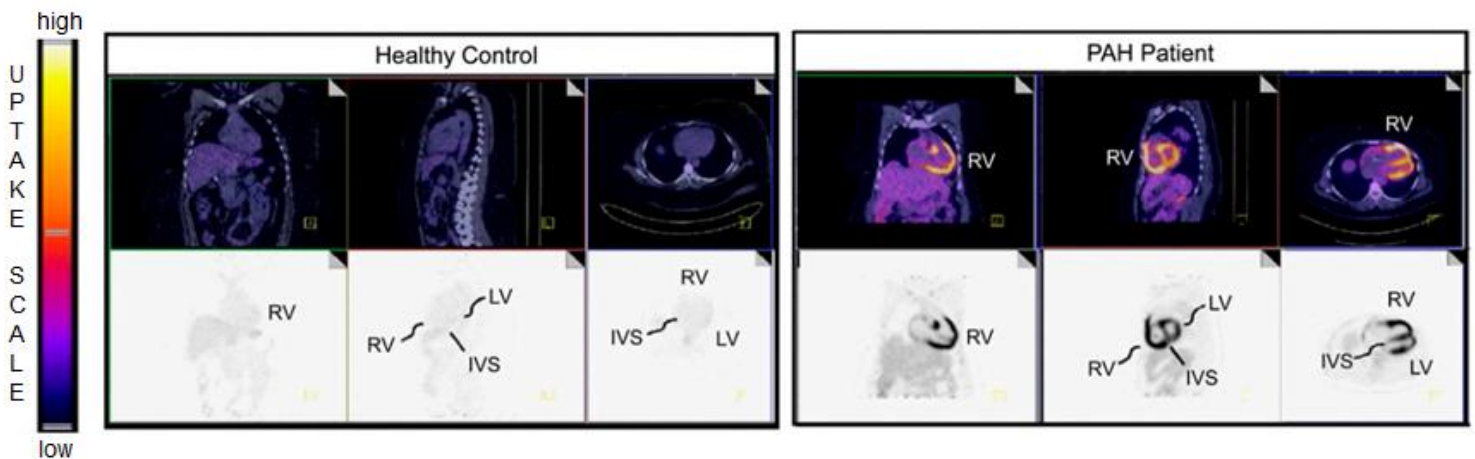


Figure 33 : Imagerie de l'absorption par le cœur du ^{18}F FDG chez un patient sain et un patient atteint d'HTAP. On peut observer une absorption du ^{18}F FDG beaucoup plus importante chez le patient HTAP, imagée en couleur rouge/jaune. RV : VD ; LV : VG ; IVS : septum interventriculaire. Issue de (Lundgrin et al. 2013).

Une autre modification métabolique a été identifiée dans le VD en HTP, il s'agit de **l'augmentation de la glutaminolyse**, observée dans une étude menée sur le modèle MCT. Tout comme la glycolyse aérobie, la glutaminolyse est une voie métabolique permettant la croissance rapide des cellules. Dans cette étude, l'inhibition de la glutaminolyse a engendré l'augmentation de l'oxydation du glucose et amélioré la fonction du VD (Piao et al. 2013).

3. Activation sympathique du ventricule droit

Le circuit cardiopulmonaire est la cible principale du système nerveux sympathique. Pour rappel, l'activation des nerfs sympathiques mène au relargage de catécholamines qui vont entraîner une vasoconstriction pulmonaire. Le système nerveux sympathique régule aussi la

fonction du VD. En conditions physiologiques, les récepteurs β -adrénergiques (1 et 2) augmentent la contractilité et la fréquence cardiaque (Maron et Leopold 2015).

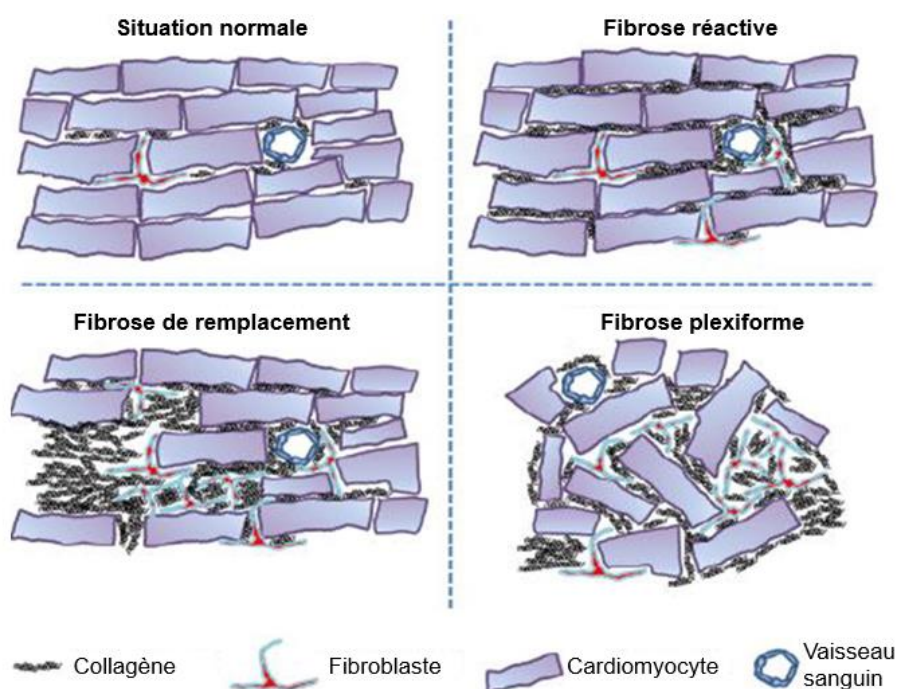
Les patients atteints d'HTP avec défaillance cardiaque droite ont des taux importants de catécholamines circulantes et perdent la capacité à augmenter le niveau de ces catécholamines lors d'un exercice. Ce taux de catécholamines circulantes permettrait même de prédire le pronostic des patients (Nootens et al. 1995).

De plus, la réponse inotrope (qui correspond à la contractilité cardiaque) aux agonistes des récepteurs β adrénergiques est altérée. Ceci est le reflet d'une **régulation négative et d'une désensibilisation des récepteurs β adrénergiques** (Piao et al. 2012). Dans le cas d'un VD adapté (modèle PAB) ces modifications sont observées uniquement sur le VD, mais s'étendent au VG dans un modèle plus grave et désadapté (modèle SuHx) (Piao et al. 2012). La régulation négative des récepteurs β_1 pourrait expliquer pourquoi les patients HTP répondent si mal aux inotropes tels que la dobutamine (Ryan et Archer 2014).

Le système rénine-angiotensine-aldostérone serait aussi activé en HTP et favoriserait le remodelage vasculaire pulmonaire et du VD en stimulant la prolifération cellulaire, l'hypertrophie et la fibrose. Il existe un dialogue entre ce système et le système nerveux sympathique. Il semblerait que l'activation de ces 2 systèmes ne soit pas une cause de la pathologie mais plutôt une conséquence (Maron et Leopold 2015).

4. Fibrose du ventricule droit

La fibrose cardiaque peut exister sous différentes formes ([Figure 34](#)). La **fibrose réactive** correspond à un dépôt interstitiel de collagène autour des cardiomyocytes et des fibres myocardiques et peut aussi être localisée dans les espaces périvasculaires. Une **fibrose de remplacement** se développe suite à l'endommagement des cardiomyocytes et est révélée par la présence de foyers fibreux présents à la place des cardiomyocytes endommagés. Un autre type de fibrose cardiaque, appelée **fibrose plexiforme**, est caractérisé par la déstructuration des fibres de collagène dans des zones de désorganisation du tissu myocardique. Cette forme de fibrose est souvent observée aux points d'insertion des ventricules sur le septum interventriculaire (Egemnazarov et al. 2018).



[Figure 34](#) : Résumé des différents types de fibrose cardiaque. Adaptée de (Egemnazarov et al. 2018).

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour étudier la fibrose du VD en HTP et des variations entre les modèles ont été révélées. Dans le modèle d'HC chez le rat, dans la majorité des études, une fibrose du VD est observée. L'addition d'un inhibiteur du VEGF (Su5416) à l'HC induit une HTP plus sévère et une fibrose du VD plus étendue. La majorité des études utilisant le modèle d'HTP induit par MCT et le modèle de PAB ont aussi montré une fibrose du VD (Rain et al. 2016) (Bogaard et al. 2009) (Egemnazarov et al. 2018).

L'accès restreint au tissu ventriculaire droit de patients HTP rend difficile l'évaluation de la fibrose chez l'homme. Une seule technique non invasive permet d'évaluer la fibrose cardiaque *in vivo*, il s'agit de l'**administration de gadolinium sous IRM**. Les zones de rétention de ce produit de contraste corrélent avec les zones de fibrose. La majorité des études ont montré un lien entre la rétention du gadolinium et la fonction du VD. En effet, la rétention du gadolinium est corrélée à l'hémodynamique pulmonaire, à la fonction du VD et à son remodelage (Shehata et al. 2011). Il s'agirait d'un marqueur de l'état d'avancement de la pathologie et d'un prédicteur d'un pronostic défavorable (Freed et al. 2012). Cependant, certaines études ne font pas cette observation. Ceci peut être dû à l'hétérogénéité des patients inclus dans les études, certaines incluant des patients avec des HTP des 5 groupes. De plus, plus la pathologie est sévère plus il y a de chance d'observer une rétention du gadolinium (Freed et al. 2012). Une hétérogénéité de sévérité des patients inclus pourrait aussi expliquer cette discordance entre les études.

L'étude de Bradlow et al. a permis une comparaison directe entre la rétention du gadolinium dans le VD et des analyses histologiques de tissu ventriculaire droit de patients HTP. Il a observé la présence de fibrose plexiforme aux points d'insertion du VD sur le septum (Figure 35). Néanmoins, selon lui, cette forme de fibrose est une caractéristique normale de l'anatomie de cette région du cœur. Elle est tout de même accentuée dans le VD hypertrophié de patients HTP. Dans cette étude, aucune fibrose de remplacement n'a été observée (Bradlow et al. 2010). Cependant, une autre étude a révélé la présence de fibrose péri-vasculaire et interstitielle chez des patients atteints d'HTAP idiopathique mais la région du VD analysée n'est pas précisée (Gomez-Arroyo et al. 2014). De plus, d'après l'étude de McCann, la rétention du gadolinium, retrouvée uniquement aux points d'insertion du VD sur le septum, est liée à la présence de fibrose qui participe à la dysfonction systolique du VD (McCann et al. 2007).

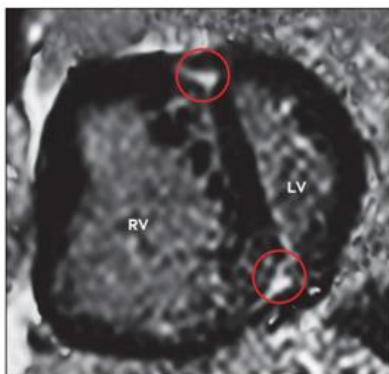


Figure 35 : IRM cardiaque montrant la rétention de gadolinium (cercles rouges) aux points d'insertion du VD sur le septum interventriculaire. RV : VD et LV : VG. Issue de (Freed et al. 2012).

La présence de fibrose a été décrite histologiquement chez des patients atteints d'HTAP idiopathique et les auteurs ont conclu qu'elle participait en partie à la dysfonction diastolique du VD (Rain et al. 2013). Une autre étude menée sur des patients atteints d'HTAP héritable et des patients atteints d'HTAP idiopathique a révélé un degré de fibrose du VD similaire dans les 2 groupes. La partie du VD analysée n'étant pas précisée, il n'est pas possible de savoir dans quelle région du VD cette fibrose a été retrouvée (van der Bruggen et al. 2016). Ce sont les seules formes d'HTP où une fibrose du VD a été décrite d'un point de vue histologique.

La fibrose étant peu étudiée dans le VD en HTP, peu d'études ont cherché à savoir si elle entraînait des conséquences fonctionnelles. Une étude de Rain et al. a démontré que l'augmentation de la fibrose du VD altère la fonction diastolique du VD (Rain et al. 2016). Le rôle de la fibrose dans le développement de l'HTP est encore mal connu. Cependant, il a été postulé que les territoires fibreux peuvent induire une hétérogénéité électrique du cœur et donc promouvoir l'arythmie (Egemnazarov et al. 2018).

5. Inflammation du ventricule droit

Un afflux de cellules inflammatoires a été observé dans le VD défaillant de patients présentant une HTP associée à une sclérose systémique. Cette observation n'a pas été faite chez les patients atteints d'HTAP idiopathique (Overbeek et al. 2010).

Cependant, tous les modèles animaux d'HTP présentent une augmentation du niveau de cytokines circulantes qui vont affecter la contractilité et le remodelage du VD, induisant hypertrophie, apoptose et fibrose (Rondelet et al. 2012) (Campian et al. 2010) (M. L. Handoko et al. 2009) (Samson et Paulin 2017). Les données expérimentales existantes suggèrent que l'inflammation se déroule plutôt dans les premiers temps de la pathologie et lors de la transition de l'état adapté à l'état désadapté (Campian et al. 2010) (M. L. Handoko et al. 2009). Il est possible que l'inflammation ne soit plus présente ou active dans la phase terminale de la pathologie (état désadapté).

Les études précliniques suggèrent que l'inflammation est un point clé du cercle vicieux qui existe entre le VD et la circulation pulmonaire. L'hypothèse actuelle est que l'inflammation péri-vasculaire joue un rôle dans le remodelage vasculaire pulmonaire qui mène à une augmentation du stress mécanique et de l'ischémie du VD. De plus, l'inflammation initiale de la circulation pulmonaire augmente l'inflammation dans la circulation systémique, déclenchant celle du VD. L'inflammation du VD va participer à sa dysfonction. Dans ce cœur défaillant, une augmentation des modifications neuro-hormonales, de l'ischémie et du stress mécanique vont favoriser le remodelage vasculaire pulmonaire. Au fur et à mesure, un cercle vicieux se crée entre l'inflammation du VD, le VD dysfonctionnel et le remodelage vasculaire pulmonaire (X.-Q. Sun, Abbate, et Bogaard 2017).

Les bénéfices d'un traitement anti-inflammatoire sont toujours flous pour le VG. Cependant, les thérapies anti-inflammatoires pourraient avoir plus de résultats sur le VD dysfonctionnel suite à une HTP car, dans ce cas, l'inflammation joue un double rôle dans la pathogénèse, à la fois sur la circulation pulmonaire et sur le VD (X.-Q. Sun, Abbate, et Bogaard 2017).

III. Traitements existants pour le VD en HTP

Habituellement, en HTP, les thérapies ciblent la post charge du VD, donc la circulation pulmonaire, qui est gravement remodelée et qui est la cause de la dysfonction du VD. Les traitements ciblant le système vasculaire pulmonaire se sont considérablement développés

ces dernières années et permettent de réduire la post-charge du VD. Cependant, les médicaments réduisant la post-charge ont une efficacité limitée dans le temps. **L'utilisation de traitements combinés, ciblant à la fois le système vasculaire pulmonaire et le VD, serait intéressante pour améliorer la survie des patients.** Les thérapies ciblant le VG sont beaucoup plus avancées et couramment utilisées, elles pourraient donc être utilisées pour le VD. Cependant, appliquer ces thérapies au VD requiert des essais cliniques préalables. De plus, de par les nombreuses différences existant entre les 2 ventricules, il semblerait peut être plus judicieux de cibler directement les mécanismes altérés du VD en HTP que d'essayer de lui appliquer les thérapies du VG. Différentes stratégies thérapeutiques sont en cours d'étude mais, à ce jour, aucune n'a été validée pour le VD des patients HTP. Voici ci-dessous un aperçu des stratégies de traitements pour le VD. Celles-ci peuvent être présentées en 2 parties, dans un premier temps les stratégies thérapeutiques ayant pour objectif de réduire la pression exercée sur la paroi du VD et, dans un deuxième temps, les stratégies pour lutter contre les effets délétères de cette pression (Westerhof et al. 2017).

1. Stratégies thérapeutiques ciblant la pression exercée sur la paroi du VD

a. Atrioseptostomie

L'atrioseptostomie, qui consiste à créer une communication entre les oreillettes gauche et droite, a été envisagée en HTP. En effet, il a été remarqué que les patients présentant une HTP associée à un foramen ovale perméable (communication physiologique présente entre les 2 atriums durant la vie fœtale) vivaient plus longtemps que ceux sans shunt intra-auriculaire. Cependant, l'ouverture entre les 2 oreillettes réduit l'oxygénation du sang puisqu'une partie du sang désoxygéné passe directement dans l'OG puis le VG et est redistribuée aux organes sans être passée par les poumons. Malgré tout, l'atrioseptostomie permet de réduire la tension sur la paroi du VD en HTP et donc d'améliorer sa fonction. Cependant, les effets bénéfiques de cette procédure sont à contrebalancer avec son caractère risqué. Le taux de mortalité suite à cette procédure est relativement élevé (15%).

De plus, tous les patients ne vont pas répondre de manière similaire à la création de ce shunt gauche-droit. Des études approfondies sur cette technique dans le cas de patients HTP doivent encore être mises en œuvre pour préciser les critères de sélection des patients (Sandoval, Rothman, et Pulido 2001) (Al Maluli et al. 2015).

b. Diurétiques

L'insuffisance cardiaque droite mène à une rétention de fluide dans le corps ce qui entraîne de l'œdème périphérique. Bien qu'il n'y ait pas d'études cliniques randomisées sur les diurétiques, l'expérience clinique montre des effets bénéfiques sur la rétention de fluide chez les patients HTP (Galiè et al. 2016). Les diurétiques jouent un rôle important dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque droite en HTP. Une étude prospective a examiné l'impact d'un antagoniste du récepteur de la vasopressine et a révélé une diminution du Brain Natriuretic Peptid (BNP) (un marqueur de dysfonction cardiaque) chez 10 patients atteints d'insuffisance cardiaque droite associée à une HTP (Tamura et al. 2015). Des études randomisées avec un groupe contrôle sont encore requises pour valider ces observations.

c. Dispositif d'assistance ventriculaire droite

L'assistance percutanée et l'oxygénation extracorporelle par membrane (plus connue sous l'acronyme ECMO) dans le cadre de l'HTP ne sont pas adéquates pour une utilisation sur le long terme. Jusqu'ici, les dispositifs d'assistance ventriculaire droite étaient utilisés dans le cas d'une insuffisance cardiaque droite et gauche combinée, dans l'attente d'une greffe cardiaque. Une seule étude préclinique reporte l'utilisation d'un dispositif d'assistance ventriculaire droite sur un modèle PAB chez le mouton. L'effet de l'implantation du dispositif juste après la ligature et 8 semaines après (ce qui est plus représentatif de la condition des patients) a été étudié. La pression artérielle s'est améliorée dans les 2 groupes, mais le débit cardiaque uniquement dans le groupe ayant reçu le dispositif juste après la ligature (Verbelen et al. 2017). De plus, le dispositif d'assistance ventriculaire droite n'a pas permis de diminuer la post-charge du VD. A ce jour, les données sont trop limitées pour utiliser ces dispositifs sur le long terme de manière sûre. Pour le moment leur usage est restreint à une utilisation uniquement au stade terminal de la pathologie, dans l'attente d'une greffe.

2. Stratégies thérapeutiques ciblant les conséquences de la pression exercée sur la paroi du VD

a. Resynchronisation cardiaque

Lorsque la pathologie est à un stade avancé, le fonctionnement du VG et du VD est asynchrone : la contraction du VD se poursuit jusqu'au début de la diastole du VG. De plus, le VD se dilate et pousse le septum interventriculaire vers le VG pour essayer de pallier à la surcharge de pression à laquelle il fait face. Par conséquent, le remplissage du VG est affecté et les battements cardiaques sont inefficaces. Une étude, menée sur cœur isolé perfusé de rats MCT, a montré que la stimulation électrique du cœur droit permettait d'améliorer la fonction systolique du VD et de réduire l'effet négatif de la contraction prolongée du VD sur la diastole du VG (M. Louis Handoko et al. 2009). Une étude a aussi été menée sur des patients présentant une dysfonction cardiaque droite et une désynchronisation cardiaque due à une HPPE. Des stimulations électriques ont été appliquées de manière séquentielle sur l'OD et le VD. Ceci a permis de réduire la désynchronisation, d'augmenter la contractilité du VD et d'améliorer le remplissage diastolique du VG (Hardziyenka et al. 2011). Contrairement au VG, peu d'études ont évalué la stimulation du VD. On peut se demander si la stimulation électrique du VD ne risque pas d'entraîner une augmentation du stress de sa paroi et de sa demande en oxygène. D'autres études sont donc clairement nécessaires avant de généraliser l'usage cette technique.

b. Soutien de l'apport en oxygène du VD

Plusieurs mécanismes induisent une ischémie du VD (voir Chapitre IV II.1), par conséquent plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour améliorer l'apport en oxygène du VD.

i. Restaurer le contenu en myoglobine

Le fer est un cofacteur important dans le transport de l'oxygène, il est nécessaire pour produire l'hémoglobine et la myoglobine qui facilitent respectivement la diffusion et le stockage de l'oxygène. Dans une étude menée sur les patients atteints d'HTAP idiopathique, 43% des patients étudiés présentaient un déficit en fer. Cette déficience en fer est corrélée à

une diminution de la distance parcourue en 6 minutes (G. Ruiter et al. 2011). Aussi, dans une autre étude, les auteurs ont testé l'administration de fer chez des patients atteints d'HTAP idiopathique et déficients en fer. La distance parcourue en 6 minutes est restée inchangée 12 semaines après l'administration, mais l'endurance des patients était augmentée. Cependant, ceci n'est pas dû à une amélioration de la fonction du VD mais plutôt à une augmentation d'oxygène au niveau des muscles squelettiques (Gerrina Ruiter et al. 2015). Des études complémentaires, permettant de déterminer le mécanisme exact de la déficience en fer et d'établir de manière contrôlée et randomisée si l'administration de fer peut être utile aux patients HTP, sont nécessaires.

ii. Augmenter la densité capillaire

Le miR-126 est spécifique de l'endothélium et impliqué dans la régulation de l'angiogenèse. L'étude complète de Potus et al. a montré plusieurs paramètres à propos de l'implication de ce miR dans l'ischémie du VD en HTP. L'analyse de biopsies de VD adaptés et désadaptés de patients HTP a montré une diminution de l'expression du miR-126 dans les VD désadaptés en comparaison aux VD adaptés. De plus, restaurer *in vitro* l'expression de miR-126 dans les cellules endothéliales issues de patients avec un VD désadapté rétablit l'angiogenèse. Enfin, la régulation à la hausse de ce miR-126 (par administration d'un mime) dans un modèle de rat MCT a induit une augmentation de la densité capillaire du VD et une diminution de sa fibrose (Potus et al. 2015). Les études sur les miR sont en plein essor ces dernières années, certaines thérapies à base de miR (mime ou inhibiteur de miR) ayant déjà été testées chez l'homme lors de phases cliniques. Ces résultats prometteurs requièrent donc une validation dans un modèle préclinique avant de passer aux essais cliniques.

iii. Cibler les mitochondries

Comme décrit dans le Chapitre IV II.2, le métabolisme passe d'une oxydation du glucose dans le VD sain à de la glycolyse dans le VD en HTP. Ce changement de métabolisme est dû, en partie, à la PDK qui va altérer la voie de l'oxydation du glucose. L'inhibition de la PDK, a permis de montrer, dans 2 modèles murins d'HTP, une augmentation de l'oxydation du

glucose, une diminution de l'hypertrophie du VD et par conséquent une amélioration de sa fonction (Piao et al. 2010).

Pour rappel, il y a une relation réciproque entre l'oxydation des acides gras et l'oxydation du glucose, telle qu'inhiber une des voies augmente l'autre. Dans un modèle de rat PAB, l'inhibition de l'oxydation des acides gras a permis de restaurer l'oxydation du glucose, d'augmenter le débit cardiaque et de réduire l'hypertrophie du VD (Fang et al. 2012). Les résultats intéressants de cette étude et le fait que les inhibiteurs utilisés soient déjà disponibles en clinique devraient mener à des essais cliniques randomisés et contrôlés pour prouver leur efficacité chez l'homme.

c. Modulation neuro-hormonale

Comme décrit dans le Chapitre IV, le système nerveux sympathique est suractivé chez les patients HTP et une diminution de la densité des récepteurs β -adrénergiques est observée.

Les β -bloquants réduisent le rythme cardiaque et donc la demande en oxygène du cœur. Ils pourraient être bénéfiques pour les patients HTP. Des études précliniques ont montré que le blocage des récepteurs β -adrénergiques induit une amélioration de la fonction du VD (Asosingh et Erzurum 2018). De plus, un essai clinique récent de phase I a démontré que le traitement de patients HTP avec un β -bloquant non spécifique, le carvedilol, est sans danger et a des effets bénéfiques. En effet, une diminution de la fréquence cardiaque et un retour rapide à un rythme cardiaque normal après un exercice ont été observés. Ce traitement permet aussi de diminuer le taux de glycolyse du VD et améliore la fonction cardiaque droite. Les effets bénéfiques observés sont associés à une augmentation du nombre de récepteurs β -adrénergiques (Farha et al. 2017). L'administration d'un autre β -bloquant, le bisoprolol, a été étudiée chez des patients atteints d'HTAP idiopathique. Cependant, malgré une diminution du rythme cardiaque, la fraction d'éjection du VD est restée inchangée et la distance parcourue en 6 minutes a été retrouvée diminuée. Dans ce cas, le traitement β -bloquant ne s'est pas montré bénéfique (van Campen et al. 2016).

En conclusion, plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant le VD se sont développées ces dernières années. Cependant, elles nécessitent des investigations plus approfondies pour qu'elles puissent un jour être proposées aux patients et ainsi améliorer considérablement leurs conditions et leur durée de vie. A ma connaissance, aucune thérapie cellulaire ciblant directement le VD en HTP n'a été développée ni même testée. De nombreuses thérapies cellulaires, administrées par différentes voies, existent déjà pour le VG et ont été testées chez l'homme (Philippe Menasché 2018a). L'objectif de ce travail de thèse était de valider la faisabilité de l'administration d'une thérapie cellulaire dans le VD d'un modèle porcin d'HTP. Vous comprendrez dans le chapitre suivant sur quels critères nous nous sommes basés pour choisir le produit de thérapie cellulaire optimal.

Chapitre V – Thérapie cellulaire ciblant le ventricule droit en HTAP

Ce chapitre est basé sur la revue « *Stem cell therapy targeting the right ventricle in pulmonary arterial hypertension : is it a potential avenue of therapy ?* » publiée dans le journal *Pulmonary Circulation* dont je suis le co-premier auteur (Loisel, Provost, Haddad, et al. 2018).

Les thérapies cellulaires ciblant le VG se sont beaucoup développées ces dernières années. Les résultats prometteurs observés dans les modèles animaux ont conduit à des essais cliniques chez l'homme qui ont montré une amélioration de la fonction du VG et du remodelage cardiaque (Philippe Menasché 2018a). De ce fait, compte tenu de l'importance de la dysfonction du VD en HTP, on peut espérer voir apparaître dans les prochaines années des thérapies cellulaires ciblant ce ventricule dans cette pathologie. Ce chapitre traite dans un premier temps des différentes voies d'administration utilisées en thérapie cellulaire cardiaque. Ensuite, les différentes études portant sur les thérapies cellulaires du VD en HTP sont décrites. Quasiment toutes les études n'avaient pas pour objectif initial de cibler le VD, mais plutôt le système vasculaire pulmonaire. Cependant, la plupart des études ont tout de même analysé la fonction du VD suite à l'administration de ces thérapies. Seuls les effets sur le VD observés dans les études citées sont mentionnés ici. Les effets observés sur le réseau vasculaire pulmonaire sont détaillés dans les tableaux récapitulatifs de la revue (Loisel, Provost, Haddad, et al. 2018). Il est à noter qu'au moment de l'écriture de la revue, les trois études existantes et ciblant le VD n'étaient pas encore publiées, elles ont été rajoutées dans ce manuscrit.

I. Voies d'administration

Comme les résultats des études sur les cellules souches dépendent non seulement du type cellulaire utilisé mais aussi de la voie d'administration choisie, les trois principales voies d'administration sont décrites ci-dessous (Figure 36).

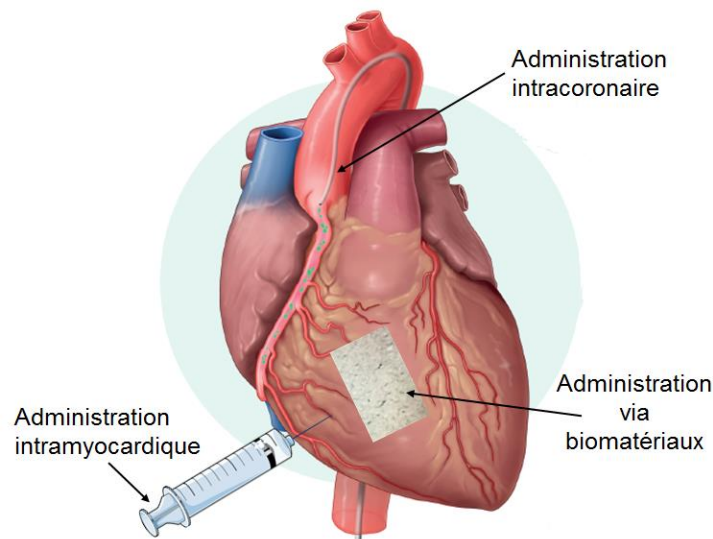


Figure 36 : Schéma récapitulant les 3 principales voies d'administration de cellules dans le VD défaillant. Adaptée de (Loisel, Provost, Haddad, et al. 2018).

1. Intracoronaire

La voie intracoronaire est la voie d'administration privilégiée et la plus étudiée. Elle est peu complexe techniquement et peu coûteuse (Dib et al. 2011).

L'injection intracoronaire de différents types cellulaires a déjà été testée dans plusieurs essais cliniques, et ceux-ci ont prouvé son innocuité et son efficacité. L'essai clinique SCIPIO (Cardiac Stem Cell Infusion in Patients With Ischemic Cardiomyopathy) a révélé que la perfusion intracoronaire de cellules souches cardiaques était efficace pour améliorer la fonction ventriculaire gauche chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque après un infarctus du myocarde (Chugh et al. 2012). Le même type d'essai a été réalisé avec des cellules souches mésenchymateuses (CSM) où les patients ont également présenté une récupération de la fonction contractile (Schächinger et al. 2009).

Les cellules sont administrées via un cathéter placé dans l'artère coronaire choisie. Lors de l'injection le flux sanguin dans les coronaires peut être maintenu ou non. Pour arrêter le flux, un ballon est utilisé pour réaliser une occlusion temporaire pour d'éviter que les cellules ne soient rapidement évacuées du tissu cardiaque (Badr Eslam et al. 2017).

Cependant, avec cette technique les cellules administrées risquent d'obstruer les vaisseaux coronaires et microvaisseaux, entraînant une nécrose du tissu qui peut aboutir à un infarctus. De plus, cette technique n'est pas applicable aux patients ayant des artères coronaires obstruées. Enfin, concernant la rétention cellulaire, l'administration intracoronaire semble avoir une efficacité moindre comparée à l'administration intracardiaque (Hou et al. 2005). Dans le cas de l'injection intracoronaire, les cellules délivrées doivent avoir des capacités migratoires pour aller vers la zone du myocarde endommagé. Le choix du type de cellule administré est donc crucial.

2. Intracardiaque

L'administration intracardiaque est la voie d'administration la plus efficace mais aussi la plus invasive (Golpanian et al. 2016) (Dib et al. 2011). Elle peut être divisée en deux sous-types : (1) injection épicardique ou intramyocardique et (2) transendocardique.

(1) L'injection **intramyocardique** est considérée comme la méthode la plus sûre. L'innocuité et la faisabilité d'une transplantation de myoblastes autologues chez des patients atteints de cardiomyopathie ischémique ont été évaluées et les résultats suggèrent qu'il s'agit d'une méthode d'administration fiable (Dib et al. 2005) (Philippe Menasché et al. 2008). De plus, l'administration épicardique semble être plus efficace que l'administration intracoronaire en ce qui concerne la rétention cellulaire (Hou et al. 2005). Pour la réaliser, il faut avoir un accès direct au cœur. Ceci peut se faire via une thoracotomie gauche ou une sternotomie. Il s'agit donc d'un geste hautement invasif mais le fait de visualiser le cœur permet d'injecter directement dans la zone dysfonctionnelle localisée au préalable par des techniques d'imagerie. Les cellules sont injectées à l'aide d'une seringue par le manipulateur. Il y a un risque de perforation du ventricule, d'embolisation, d'arythmie et d'inflammation dans la zone piquée par l'aiguille.

(2) L'administration **transendocardique** semble la plus efficace. Elle donne des résultats plus probants que l'injection intracoronaire. Vrtovec et al. ont comparé les voies d'administration intracoronaire et transendocardique de cellules CD34+ chez des patients

atteints de cardiomyopathie dilatée non ischémique. L'équipe a constaté que l'injection transendocardique était associée à une meilleure réponse clinique grâce à un taux plus élevé de rétention des cellules (Vrtovec et al. 2013). Cette technique permet une approche ciblée pour délivrer les cellules au myocarde endommagé. Cependant, elle nécessite un équipement et des compétences complexes. Le système le plus utilisé est le cathéter Myostar® combiné à un système de guidance 3D NOGA® qui réalise une cartographie cardiaque électromagnétique. C'est ce système de guidance 3D qui permet d'injecter le produit de thérapie cellulaire dans les zones qui ont été localisées au préalable par des techniques d'imagerie non invasives. Cette approche est donc beaucoup moins invasive que celle citée précédemment. En revanche, ici aussi il y a un risque de perforation du ventricule, d'arythmie et d'inflammation (Dib et al. 2011).

A ma connaissance, la voie intramyocardique n'a jamais été directement comparée à la voie transendocardique. L'administration intracardiaque présente une meilleure rétention cellulaire que l'administration intracoronaire. Malgré tout, cette rétention reste faible. Par ailleurs, un essai clinique a révélé que les cellules administrées par voie transendocardique n'exercent leur effet qu'au site d'injection (Suncion et al. 2014). Selon que l'on souhaite traiter une pathologie généralisée au ventricule ou seulement cibler une certaine zone, il est important de prendre en compte cette dernière considération. Cependant, il est à noter que les injections cellulaires entraînent une mort cellulaire considérable, pouvant être attribuée à différents aspects (Skuk, Goulet, et Tremblay 2014) (Abdelwahid et al. 2016) :

- le détachement enzymatique des cellules est une cause de mort cellulaire. En effet, les contacts intercellulaires étant rompus, les cellules peuvent entrer en anoïkis (une forme d'apoptose) quand elles restent en suspension plusieurs heures.
- le passage des cellules dans l'aiguille constitue un autre stress mécanique qui induit la mort d'une partie des cellules
- l'inflammation provoquée par l'aiguille lors de l'injection

- le tissu endommagé dans lequel elles sont administrées n'est pas très accueillant (acide, en hypoxie, en manque de nutriments et inflammé). Les cellules administrées ne sont pas forcément prêtes à supporter un environnement aussi hostile, surtout par rapport à l'environnement idéal dans lequel elles ont été cultivées avant l'injection. L'environnement extracellulaire au site de l'injection influence non seulement la survie des cellules mais aussi leur intégration dans le tissu hôte.

Pour améliorer la survie des cellules transplantées et leur intégration au tissu cardiaque, l'utilisation de biomatériaux s'est développée.

3. Par biomatériaux

Ces dernières années l'utilisation de biomatériaux comme support pour la prolifération, la croissance et la différenciation des cellules administrées a considérablement progressé.

Les biomatériaux utilisés peuvent être naturels ou synthétiques. Les **biomatériaux naturels** les plus souvent employés sont le collagène, la fibronectine et les polysaccharides. La plupart de ces biomatériaux d'origine naturelle sont biocompatibles. L'utilisation de biomatériaux synthétique permet le plus souvent un meilleur contrôle des propriétés finales du biomatériaux. Les **biomatériaux synthétiques** ont l'avantage de pouvoir être composés à façon. En effet, il est possible de contrôler la structure et la taille des pores recevant les cellules. Cependant, en dépit du fait que ces biomatériaux synthétiques soient plus facilement modulables, la plupart d'entre eux sont peu biocompatibles car ils sont souvent immunogènes. Différents types de supports cellulaire existent ([Figure 37](#)) (Simon-Yarza, Bataille, et Letourneur 2017) :

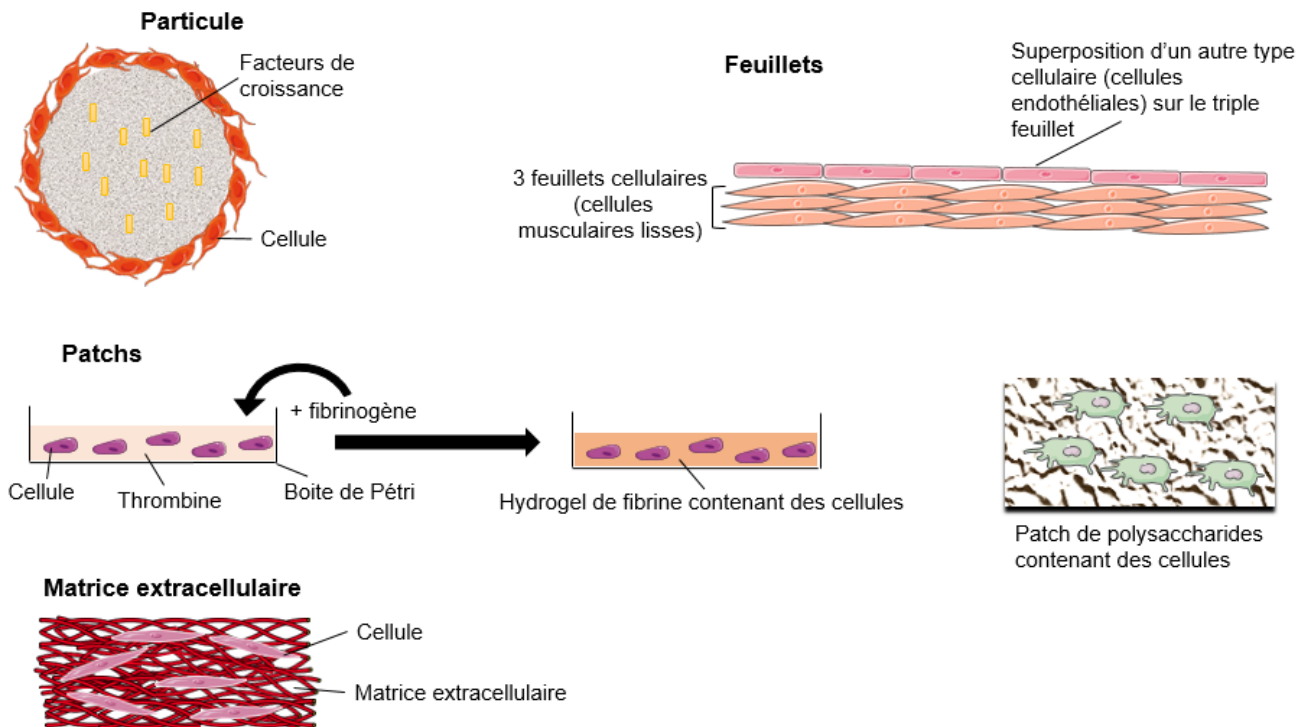


Figure 37 : Différents types de supports pour l'administration de cellules en thérapie cellulaire.

- **Particules** : les cellules sont transportées à la surface de particules qui peuvent contenir des facteurs de croissance afin de favoriser leur survie. Une étude a démontré que l'administration de particules, contenant du VEGF et à la surface desquelles des CSM ont été déposées, entraînait une amélioration de la rétention cellulaire et de la fonction cardiaque par rapport à l'administration de CSM seules et même de CSM attachées sur des particules vides. Ceci a été observé dans un modèle murin d'infarctus du myocarde où les biomatériaux ont été administrés en intracardiaque, autour de la zone infarctée. Dans ce cas, les particules utilisées étaient des microsphères d'acide poly lactique-co-glycolique contenant du VEGF et coatées avec de la fibronectine pour permettre l'adhésion des cellules (Madonna et al. 2015).
- **Feuilletts cellulaires** : pour former des feuilletts cellulaires, les cellules sont cultivées sur des polymères sensibles à la température et hydrophobes à 37°C. Une fois que la confluence est atteinte, le fait de mettre le polymère à une température plus faible le rend hydrophile et permet au feuillet cellulaire de se détacher sans étape de digestion enzymatique. Il est désormais possible de superposer ces feuilletts pour construire une

structure 3D. Shimizu et al. ont montré que le fait de superposer des feuillets cellulaires au cours de plusieurs chirurgies, espacées d'un ou 2 jours, permettait une vascularisation de la structure 3D (Shimizu et al. 2006). Ces feuillets cellulaires ont aussi été utilisés comme support pour d'autres cellules. En effet, un système de feuillets cellulaires composés de fibroblastes sur lesquels sont ensemencés des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) a été mis au point. La superposition de 3 de ces feuillets, transplantés sur le cœur de rats avec infarctus du myocarde, a montré une diminution de la formation de tissu fibreux et une augmentation de la vascularisation (Kobayashi et al. 2008). Une autre étude préclinique a développé un feuillet cellulaire composé de cellules stromales sur lesquelles des progéniteurs cardiaques ont été ensemencés. La transplantation de cette structure sur le cœur défaillant de primates non-humains a démontré son intégration au tissu cardiaque, entraînant la différenciation des progéniteurs cardiaques en cardiomyocytes et une augmentation de la densité capillaire (Bel et al. 2010). Enfin, une étude a rapporté le cas d'un patient atteint de cardiomyopathie dilatée chez qui la transplantation d'un feuillet cellulaire, composé de myoblastes autologues, a permis d'améliorer la fonction cardiaque et de lui éviter une transplantation (Sawa et al. 2012). L'avantage de ces feuillets cellulaires est l'absence de matériel étranger.

- **Patch** : de nombreux patches de compositions différentes ont été mis au point. Il est important de bien choisir la composition du patch car celle-ci peut affecter le devenir des cellules qui y sont ensemencées. Le patch peut être utilisé de deux façons : soit il sert à encapsuler les cellules pour que celles-ci puissent relarguer leur facteurs sans être rejetées par le tissu hôte, soit il sert de matrice où les cellules vont pouvoir proliférer et même se différencier (Simon-Yarza, Bataille, et Letourneur 2017). Des hydrogels composés de fibrine où sont incorporées des cellules souches ont déjà été utilisés chez l'homme. Les cellules sont mélangées à une solution de thrombine, qui, quand elle est mise en contact avec une solution de fibrinogène, se solidifie et forme ainsi une matrice 3D contenant les cellules. Ainsi, l'équipe du Pr. Menasché a réalisé en 2015 une

première mondiale en transplantant un patch de fibrine contenant des progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires à un patient souffrant d'une défaillance cardiaque sévère (Figure 38). Cette transplantation a été réalisée conjointement à un pontage coronarien. Cette étude a permis de démontrer la faisabilité de la technique et d'améliorer la condition du patient (Philippe Menasché et al. 2015). Suite à ce succès, la technique a été reproduite chez 6 patients et a confirmé la faisabilité et l'innocuité de la transplantation d'un patch de fibrine contenant des progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires, permettant ainsi de préparer le terrain pour des études de plus grande ampleur (Philippe Menasché et al. 2018). Des patchs de collagène ont aussi été utilisés comme vecteur d'administration des cellules. Lors d'un essai clinique de phase I, un patch de collagène contenant des cellules mononuclées autologues a été administré chez 10 patients ayant subi un infarctus du myocarde. Ceci a permis de démontrer la faisabilité et l'innocuité de la procédure (Chachques et al. 2008). De plus, de nombreux polysaccharides tels que l'alginate, le chitosan, le dextran et le pullulan ont aussi été étudiés pour la régénération du tissu cardiaque. En effet, ceux-ci ont l'avantage d'être biocompatibles et biodégradables (Silva et al. 2015). Il a été observé que la pose d'un patch constitué de pullulan et de dextran etensemencé avec des CSM permettait une meilleure diffusion des cellules vers le myocarde infarci que l'injection intramyocardique de CSM (Le Visage et al. 2012). Les cellules peuvent aussi être imbriquées dans de l'hydrogel liquide qui est ensuite injecté dans le cœur. L'administration de CSM intégrées dans de l'hydrogel de chitosan permet d'améliorer la fonction cardiaque de rats ayant subi un infarctus (Xu et al. 2017).

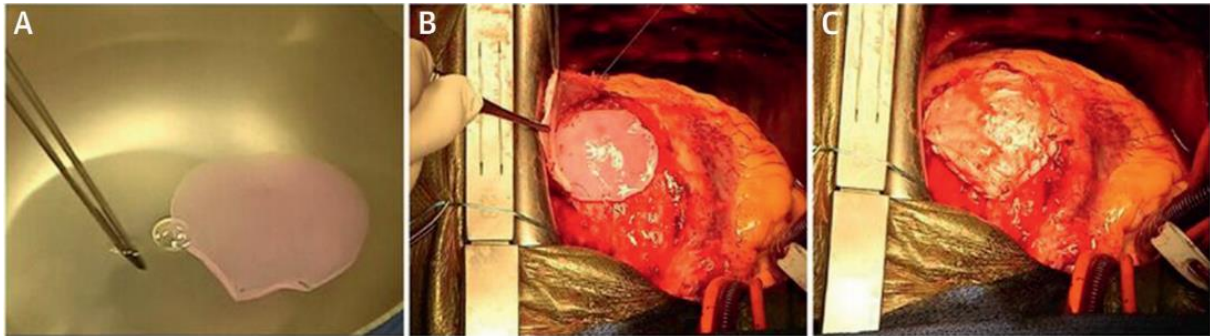


Figure 38 : Processus d'implantation du patch de fibrine contenant des progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires. A : lavage du patch de fibrine contenant les cellules dans du sérum physiologique avant implantation. B : pose du patch sur l'épicaarde da la zone infarctie. C : suture du péricarde autour de la zone infarctie qui est ensuite rabattu sur le patch de fibrine, celui-ci est donc placé en sandwich entre le feuillet de péricarde et l'épicaarde. Issue de (Philippe Menasché et al. 2018).

- **Matrice extracellulaire** : Lorsque les cellules sont injectées en suspension, elles ne possèdent plus la matrice extracellulaire qui leur sert de plate-forme et de support permettant leur développement. C'est pourquoi l'utilisation de matrices extracellulaires décellularisées est en cours d'étude. Elle a démontré des premiers résultats prometteurs mais nécessite encore beaucoup d'ajustements (Simon-Yarza, Bataille, et Letourneur 2017).

II. Thérapie cellulaire pour le VD

Compte tenu de la nature de la physiopathologie de l'HTP, idéalement les cellules souches devraient être facilement disponibles, compatibles avec le système immunitaire et pro-angiogéniques. Les cellules souches citées dans la suite de cette partie sont celles qui ont été utilisées en tant que thérapie cellulaire dans des modèles animaux d'HTP. Pour mieux comprendre leur potentiel, un bref résumé de leurs caractéristiques est rédigé pour chaque type cellulaire, suivi d'un descriptif des résultats de l'administration de ces cellules dans des modèles d'HTP. Pour rappel, quasiment toutes les études n'avaient pas pour objectif initial de cibler le VD, mais plutôt le système vasculaire pulmonaire.

1. Cellules souches mononucléées

Le sang de cordon ombilical (SCO) constitue une source de cellules souches mononucléées, relativement accessibles car elles peuvent être isolées par centrifugation en gradient de densité (Ficoll) (Fuss et al. 2009). Il a été montré *in vitro*, que ces cellules ont une fonction similaire à celle des péricytes: elles agissent comme des cellules murales proangiogéniques en soutenant la formation du réseau vasculaire développé à partir de progéniteurs endothéliaux (Peters et al. 2015). Elles ont également un potentiel anti-fibreux et pro-angiogénique *in vivo* (Oommen et al. 2015). Étant donné que les cellules souches mononucléées comprennent de nombreux types cellulaires différents (Figure 39), il est difficile de déterminer celui qui est responsable d'un effet bénéfique potentiel. Le SCO est actuellement la source de cellules souches la plus répandue (Smith et Wagner 2009). Toutefois, il s'agit d'une source allogénique, ce qui constitue une limitation importante de son utilisation.

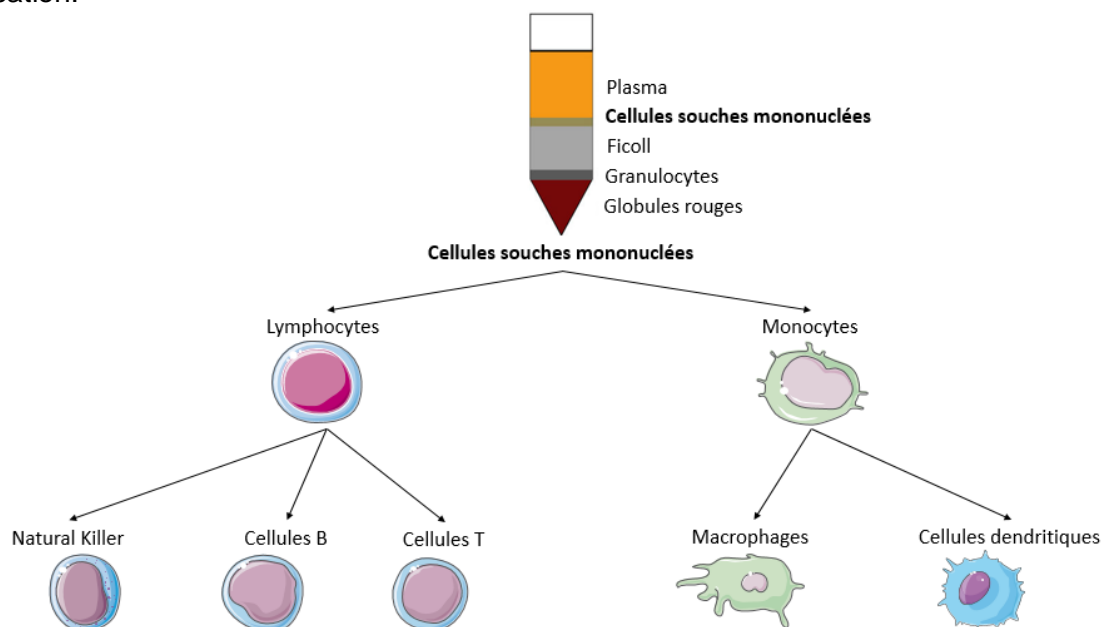


Figure 39 : Méthode d'isolement des cellules mononucléées. L'isolement des cellules mononucléées permet de récupérer différents types cellulaires tels que des cellules Natural Killer, des lymphocytes T et B, des macrophages et des cellules dendritiques. Issue et adaptée de (Loisel, Provost, Haddad, et al. 2018).

Quelques études ont analysé l'effet des cellules souches mononucléées dans des modèles d'HTP. Cantero Peral et al. ont démontré que l'injection autologue de ces cellules dans l'épicaarde du VD de porcelets est sûre et faisable. En effet, il n'y a pas eu de lésions

cardiaques significatives provoquées par l'injection : pas d'élévation du taux de troponine T cardiaque ni d'arythmie (Cantero Peral et al. 2015). Dans un modèle chronique de surcharge de volume du VD, Yerebakan et al. ont montré que l'injection épicaudique de cellules souches mononucléées améliorait la fonction diastolique du VD et augmentait la densité capillaire dans la zone d'injection (Yerebakan et al. 2009). De plus, dans un modèle murin de PAB, les injections de cellules souches mononucléées ont permis d'améliorer la fonction du VD, de réduire sa fibrose et d'augmenter l'expression de biomarqueurs de l'angiogenèse (Oommen et al. 2015). Enfin, dans un modèle ovin de PAB, les injections épicaudiques de cellules souches mononucléées ont amélioré les fonctions diastoliques et systoliques du VD (Davies et al. 2010).

2. Progéniteurs endothéliaux circulants

Asahara et al. ont découvert en 1997 les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) pouvant être isolés à partir de sang périphérique, de sang du cordon ombilical ou de la moelle osseuse (Asahara et al. 1997). Pour être définies comme PEC, les cellules doivent exprimer un ensemble de marqueurs distinctifs, sachant que les PEC partagent des marqueurs communs avec d'autres types cellulaires. C'est pourquoi d'autres caractéristiques sont requises pour définir les cellules comme étant des PEC, telles que des propriétés phénotypiques et fonctionnelles spécifiques : la formation de structures tubulaires (Yamamoto et al. 2003), la capacité à migrer en réponse à des stimuli (par exemple, VEGF), l'incorporation du Low Density Lipoprotein (LDL)- acétylé... (Tilling, Chowienczyk, et Clapp 2009). Les PEC peuvent être divisés en trois sous-populations: les unités formant colonies-Hill (CFU-Hill), les PEC précoces et les PEC tardives. De nombreuses études ont porté sur l'administration de PEC autologues en tant que traitement de l'HTP. Cependant, il n'y a pas eu de définition consensuelle des PEC et, comme précédemment, les auteurs n'ont pas ciblé spécifiquement le VD dans leurs études.

Yip et al. ont observé une diminution de l'hypertrophie et la pression systolique du VD après injection intraveineuse de PEC autologues chez des rats MCT (Yip et al. 2008). Xia et al. ont

également obtenu des résultats positifs avec des PEC isolés à partir de sang périphérique adulte et injectés à des rats MCT (Xia et al. 2009). Mirsky et al. ont injecté des CFU-Hill chez des rats MCT en intraveineux et n'ont observé aucun effet bénéfique (Mirsky et al. 2011). Dans l'étude réalisée par Ormiston et al., contrairement aux PEC tardives, les PEC précoces étaient en mesure d'empêcher l'augmentation de l'hypertrophie et de la pression systolique du VD induite par l'HTP (Ormiston et al. 2010).

D'autres études ont produit des PEC modifiés sécrétant de la prostacycline (L. Zhou et al. 2013) ou de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) (Y. D. Zhao et al. 2005), qui sont de puissants vasodilatateurs pulmonaires. Dans les deux cas, les PEC modifiés et injectés en intraveineuse chez des rats MCT étaient plus efficaces que les PEC contrôles dans la réduction de l'hypertrophie et de la pression systolique du VD.

La combinaison de l'administration de PEC avec les thérapies médicamenteuses utilisées en HTP et ciblant la structure vasculaire pulmonaire a également été étudiée. L'administration de PEC associée à du sildénafil (un inhibiteur de la PDE-5) (Yen et al. 2013) ou du cilostazol (un inhibiteur de la PDE-3) (C.-K. Sun et al. 2009) permet de limiter la progression de l'HTP et d'atténuer l'hypertrophie et la pression systolique du VD chez les rats MCT.

Concernant les essais chez l'homme, Wang et al. ont étudié la faisabilité, l'innocuité et l'effet de la perfusion intraveineuse de PEC autologues chez des patients atteints d'HTAP idiopathique. Ils n'ont pas étudié spécifiquement la fonction du VD chez ces patients, bien qu'ils aient observé une amélioration significative de la PAPm, de la résistance vasculaire pulmonaire et du débit cardiaque. Cette étude préliminaire a montré que la greffe de PEC autologues peut être bénéfique chez les patients atteints d'HTAP idiopathique (X.-X. Wang et al. 2007). Le même type d'étude a été menée chez des enfants atteints d'HTAP idiopathique, et les résultats étaient similaires: une perfusion intraveineuse de PEC autologues était possible et associée à une amélioration de la capacité d'exercice et de l'hémodynamique pulmonaire (Zhu et al. 2008). L'essai de phase I PHACeT (Pulmonary Hypertension and

Angiogenic Cell Therapy) visait à évaluer l'innocuité de l'injection de PEC transfectés avec eNOS chez des patients atteints d'HTP qui étaient réfractaires aux traitements spécifiques. Trois administrations de PEC transfectés ont été effectuées dans l'OD de 7 patients. Même si, une fois encore, la fonction du VD n'a pas été étudiée, cet essai a montré la bonne tolérance de la perfusion cellulaire et que la distance de marche de 6 minutes était significativement augmentée à 1, 3 et 6 mois (Granton et al. 2015). Il s'agit des seuls essais cliniques étudiant l'effet de thérapie cellulaire chez des patients atteints d'HTP.

3. Cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse, de la gelée de Wharton, du placenta, du tissu adipeux et du muscle. Ces cellules multipotentes peuvent se différencier en divers types cellulaires, notamment les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes (Fernández Vallone et al. 2013). Les CSM ont la capacité de migrer vers les tissus pulmonaires lésés où elles sécrètent des facteurs angiogéniques, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (van der Laarse, Cobbaert, et Umar 2015). Dans des conditions normales ou hypoxiques, elles sécrètent des facteurs stimulant la chimiotaxie et l'adhésion des cellules endothéliales (Burlacu et al. 2013). La tolérance immunitaire des CSM est une caractéristique importante qui les rend très appropriées pour une utilisation clinique (Castro-Manrreza et Montesinos 2015). Compte tenu de leurs effets pro-angiogéniques et cytoprotecteurs, dus à la libération de facteurs paracrines, les CSM sont des candidats attractifs pour la thérapie cellulaire de l'HTP. Cependant, il faut savoir que les propriétés des CSM ainsi que l'efficacité de production selon la méthode d'isolement choisie peuvent varier en fonction du tissu d'origine (Hass et al. 2011).

Plusieurs travaux ont étudié le potentiel thérapeutique des CSM en HTP. Il a été démontré que l'injection intraveineuse de CSM améliorait l'hypertrophie et la fraction d'éjection du VD dans un modèle murin d'HTP induit par MCT (Lee et al. 2015). Une diminution du rapport VD/VG+septum (poids) après injection de CSM a également été observée dans un modèle de surcharge induit par shunt gauche-droit (Luan et al. 2012).

L'administration intraveineuse de cellules souches embryonnaires (CSE) a donné de meilleurs résultats par rapport aux CSM en termes d'amélioration de l'hypertrophie et de la pression systolique du VD chez les rats MCT (Zhang et al. 2012).

Kanki-Horimoto et al. ont administré en intraveineux des CSM surexprimant eNOS chez des rats MCT. Ils ont constaté que la pression systolique du VD et le ratio VD/poids corporel étaient plus faibles dans le groupe CSM-eNOS que dans le groupe témoin (Kanki-Horimoto et al. 2006). Une autre étude a utilisé les CSM exprimant l'hème oxygénase-1, qui a une fonction protectrice et restaure l'homéostasie dans de nombreuses pathologies. L'injection intraveineuse de ces cellules dans un modèle d'HTP induite par HC a abouti à une diminution de la pression systolique et de l'hypertrophie du VD (Liang et al. 2011). Kang et al. ont injecté par voie intraveineuse, chez des rats MCT, des CSM possédant un facteur sensibilisant au gradient chimiotactique. Leur étude a révélé que les CSM sensibilisées induisaient des améliorations plus importantes que les CSM contrôles (Kang et al. 2015).

Les seuls travaux ciblant directement le VD par leur thérapie cellulaire portent sur l'utilisation de CSM. Wehman et al. ont administré des CSM par voie intracardiaque chez des porcs néonataux PAB. Quatre semaines plus tard, ils ont pu observer que les CSM préservent la fonction du VD et atténuent son remodelage (diminution de l'hypertrophie et de la fibrose, augmentation de la densité capillaire et du recrutement de cellules souches cardiaques endogènes). Toutefois, l'administration a été réalisée seulement 30 min après la mise en place du modèle ce qui ne reflète pas vraiment une pathologie chronique telle que l'HTP. De plus, cette étude cible uniquement les pathologies cardiaques congénitales et non l'HTP (Wehman, Sharma, et al. 2016). L'administration intracoronaire de CSM dans le VD d'un modèle porcin de ligature de la veine pulmonaire (modèle d'une HTP post-capillaire) a montré la rétention de ces cellules dans le VD et une augmentation de la densité capillaire. Cependant, dans cette étude le choix des contrôles est discutable. De plus, il n'y a eu aucune évaluation du VD, il est donc impossible de dire si les cellules administrées ont eu un effet thérapeutique (Badr Eslam et al. 2017).

4. Cellules progénitrices cardiaques (CPC)

Les cellules progénitrices cardiaques (CPC) correspondent à un groupe hétérogène de cellules identifiées dans le cœur adulte. Elles sont caractérisées par l'expression de c-Kit, Sca-1 et SSEA-1. Le potentiel thérapeutique des CPC a déjà été documenté pour l'infarctus du myocarde (Tian et al. 2015). Il semblerait qu'elles stimulent les cardiomyocytes et la transdifférenciation des cellules vasculaires, ainsi que la sécrétion de facteurs paracrines qui favorisent la néovascularisation et l'activation des CPC endogènes (P. Menasché et Vanneaux 2016). Ces propriétés pourraient être bénéfiques pour le VD en HTP. Cependant, l'isolement des CPC adultes est une procédure hautement invasive car ces cellules sont isolées à partir de tissu cardiaque du patient. Pour éviter ceci les progéniteurs cardiaques peuvent dériver de CSE humaines ou d'iPS.

A ce jour, une seule étude a utilisé des CPC issus de biopsies atriale droite humaine pour améliorer la dysfonction cardiaque droite. Des porcs PAB ont reçu une injection intra myocardique de CPC juste après la ligature de l'artère pulmonaire et ont été sacrifiés un mois après. Une diminution de la dilatation du VD et une amélioration de sa contractilité ont été observées. De plus, la paroi du VD présentait une augmentation de la densité capillaire et une diminution de la fibrose (Wehman, Siddiqui, et al. 2016).

Les cellules dérivées de cardiosphère (CDC) sont une autre option et peuvent être obtenues à partir de biopsies humaines adultes. Des études récentes ont montré que les exosomes libérés par les CDC humaines sont cardioprotecteurs (Barile et al. 2014) (Kervadec et al. 2016). L'utilisation de progéniteurs cardiaques dérivés des CSE humaines constitue une alternative beaucoup moins invasive que l'utilisation de CPC. Néanmoins, à ma connaissance, l'utilisation de CDC ou de progéniteurs cardiaques dérivés des CSE humaines n'a pas été étudiée dans le cadre du VD en HTP. L'utilisation de CPC comme thérapie cellulaire pourrait s'avérer utile pour prévenir l'apoptose et la fibrose des cardiomyocytes. Dans le cas de l'HTP, les cardiomyocytes subissent une hypertrophie plutôt

qu'une apoptose. Par conséquent, il n'est pas sûr que l'utilisation de CPC ou de CDC en cas de dysfonction du VD dans l'HTP soit pertinente.

5. Cellules souches dérivées du tissu adipeux

Les cellules souches dérivées du tissu adipeux (CSTA) peuvent être facilement isolées par liposuccion et conviennent à une auto-transplantation. Les CSTA peuvent favoriser l'angiogenèse dans les modèles d'ischémie des membres inférieurs, à la fois en se différenciant en cellules endothéliales et en sécrétant des facteurs paracrines (Cao et al. 2005) (Rehman et al. 2004). Par conséquent, les CSTA semblent être un bon choix de cellules souches pour traiter le VD dans l'HTP, car, en plus d'être autologues, abondantes et faciles à obtenir, elles peuvent induire une angiogenèse.

L'utilisation de CSTA chez les rats MCT améliore le remodelage vasculaire pulmonaire et diminue l'hypertrophie du VD (Luo et al. 2015). De plus, il a été montré que les CSTA transduisent pour exprimer la cyclooxygénase-1 atténuée l'hypertrophie du VD et l'HTP induite par le MCT (Somanna et al. 2014).

La majorité des études de thérapie cellulaire dans l'HTP ont été conçues pour traiter les dysfonctions observées au niveau du système vasculaire pulmonaire et non la dysfonction cardiaque droite. Elles ont toutes montré une amélioration des lésions pulmonaires et des effets sur le VD. Cependant, il est important de souligner que les effets bénéfiques observés sur la fonction ventriculaire peuvent être obtenus indirectement, via l'action des cellules sur le système vasculaire pulmonaire et plus précisément via la réduction de la post-charge. **D'après les résultats de ces études, il est donc difficile de dire si les effets bénéfiques observés sur le VD ont un lien direct avec l'administration des cellules souches ou s'ils sont dus à une amélioration de la maladie vasculaire pulmonaire.**

III. Quelle est la thérapie cellulaire idéale pour cibler le VD en HTP ?

Une thérapie cellulaire ne se résume pas au choix du type cellulaire idéal pour la pathologie ciblée, elle englobe différents aspects qui sont discutés ci-dessous.

1. Administration autologue ou allogénique ?

D'un point de vue immunologique, l'administration de cellules autologues semble la solution la plus appropriée pour éviter une réaction immunogène de l'hôte et l'utilisation d'une thérapie immunosuppressive (Segers et Lee 2008). Administrer au patient ses propres cellules signifie qu'elles doivent être isolées au préalable. Le fait qu'au moment du diagnostic de l'HTP les patients soient souvent déjà gravement atteints pourrait affecter l'état des cellules isolées (Junhui et al. 2008a). De plus, réaliser un prélèvement de sang sur ces patients pourrait aggraver leur état. Une solution est l'administration allogénique de cellules. Celles-ci peuvent être isolées au préalable à partir de moelle osseuse, de sang de donneurs sains ou de SCO, conservées dans des banques, et administrées dès que nécessaire au patient. Il faut savoir que la conservation de SCO à des fins autologues (ou pour son propre enfant) est interdite par la loi en France (Agence de la Biomédecine). Une autre option consiste à utiliser des cellules iPS dérivées des propres fibroblastes du patient. Cependant à ce jour, l'utilisation d'iPS chez l'homme a fait l'objet d'un seul essai clinique portant sur la dégénérescence maculaire liée à l'âge et l'essai est suspendu (Mandai, Kurimoto, et Takahashi 2017). L'idée d'utiliser des cellules iPS allogéniques provenant d'une banque de cellules iPS plutôt que celles du patient est en train de se développer. Avant d'utiliser les iPS pour les pathologies cardiaques, il est nécessaire de mieux maîtriser leur production. L'utilisation de progéniteurs cardiaques dérivés de CSE se développe considérablement et a déjà donné des résultats très intéressants (Philippe Menasché et al. 2018). Pour des raisons pratiques, les cellules doivent être rapidement disponibles et en nombre suffisant au moment de l'injection. Cela signifie que les cellules isolées doivent avoir préalablement subi une cryoconservation, même si cette méthode de conservation n'est pas optimale pour maintenir les propriétés des cellules (Hunt 2011).

2. Quel timing d'administration ?

Il semblerait logique de penser que plus l'administration des cellules est précoce, plus les effets observés seront importants. Cependant, les essais cliniques chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde montrent des résultats variables (Wu, Hu, et Wang 2018). Toutefois, il est difficile de comparer les répercussions sur une pathologie aiguë (infarctus) lorsque l'on travaille sur une pathologie chronique (HTP). L'HTP étant le plus souvent diagnostiquée à un stade avancé, il serait souhaitable d'administrer les cellules au plus tôt pour freiner le remodelage du VD. Comme il s'agit d'une pathologie chronique, il est possible que des administrations répétées potentialisent les effets de la thérapie cellulaire. Une étude a en effet montré que l'administration répétée de CPC est plus efficace qu'une seule administration (Tokita et al. 2016). Cependant, il faut toujours garder en tête la faisabilité : anesthésier régulièrement le patient pour lui administrer les cellules pourrait être compliqué à mettre en place. De plus, ceci demande des critères clairs quant aux conditions de ré-administration.

3. Quelle voie d'administration ?

Concernant la voie d'administration, étant donné qu'il y a très peu d'études concernant l'injection de cellules pour traiter le VD, il est préférable de se baser sur les études réalisées sur le VG (voir précédemment Chapitre V partie I). Cependant, le VD et le VG étant légèrement différent, je pense qu'il est intéressant d'étudier les principales voies d'administration pour découvrir celle qui sera optimale.

4. Quelles cellules ?

Le VD en HTP subit tellement de modifications que sélectionner un seul type cellulaire permettant de toutes les résoudre paraît illusoire. Pour rappel, le VD en HTP présente une ischémie, un shift de son métabolisme, de la fibrose, de l'inflammation et une hypertrophie. Bien que des études supplémentaires soient requises pour mieux connaître les voies impliquées dans la dysfonction du VD en HTP, les résultats s'accordent pour dire que l'ischémie du VD constitue un point clé car elle marque la transition entre son état adapté et désadapté. Si l'on raisonne ainsi, les cellules les plus appropriées pour pallier à l'ischémie du

VD sont les PEC. En effet, ces cellules ont la capacité de former de nouveaux vaisseaux et de participer à la réparation de ceux lésés (Critser et Yoder 2010). Les CSM, de par leur propriétés anti-inflammatoires et pro-angiogéniques sont aussi de bonnes candidates pour améliorer le VD en HTP (Castro-Manrreza et Montesinos 2015). Comme cela a déjà été réalisé dans quelques études sur l'ischémie des membres inférieurs, il serait intéressant de les associer aux PEC.

5. Quel dosage ?

Les doses de cellules administrées dans les essais cliniques ou les études précliniques sont très variables. Le dosage dépend principalement du nombre de cellules qui peut être obtenu. Le choix de la dose optimale est déterminant pour favoriser la réparation du tissu cardiaque. Des études utilisant des doses croissantes de cellules ont abouti à des conclusions différentes. Certaines n'observent un effet bénéfique que lorsqu'une forte dose de cellules est administrée tandis que d'autres trouvent une dose-réponse inversée : les plus fortes doses sont les moins efficaces (Hare et al. 2012) (Wu, Hu, et Wang 2018). Il semblerait que ce soit la concentration des cellules lors de l'administration plutôt que leur nombre qui impacte l'effet sur le tissu cardiaque (Hare et al. 2012).

Au cours de cette thèse, il a été choisi d'administrer des PEC afin d'observer leur effet sur le VD du modèle porcin de défaillance cardiaque droite mis au point à l'hôpital Marie Lannelongue. Les voies d'administration intracoronaire et intracardiaque ont fait l'objet d'études complètes et un essai d'administration par patch a été effectué. Ces cellules sont décrites plus en détail dans le chapitre suivant.

Chapitre VI – Les progéniteurs endothéliaux circulants

I. Les progéniteurs endothéliaux circulants

1. Première découverte

Les cellules endothéliales progénitrices ont été décrites pour la première fois en 1997 par Asahara et al.. Dans un premier temps, les auteurs ont isolé des cellules mononuclées à partir de sang périphérique adulte. Ils ont montré qu'une partie de cette population cellulaire, isolée sur la base de l'expression du marqueur CD34 et mise en culture en présence de facteurs de croissance, pouvait se différencier en cellules endothéliales (Asahara et al. 1997). L'administration de ces cellules dans un modèle murin ayant subi une exérèse de l'artère fémorale a montré qu'elles pouvaient participer à l'angiogenèse en migrant vers le site ischémié. Par la suite, il a été montré que ces cellules exprimaient le VEGFR-2 et le CD31 et qu'elles étaient capables d'internaliser le LDL acétylé, comme les cellules endothéliales. Suite à ces observations, l'hypothèse était que les cellules endothéliales progénitrices pouvaient régénérer les vaisseaux lésés ou favoriser la croissance de néo-vaisseaux en proliférant au site de la lésion. Cependant, une analyse plus détaillée a montré que ces cellules étaient en fait très peu prolifératives, d'origine monocytaire et non endothéliale (Rehman et al. 2004). Ces résultats ont suggéré que les cellules découvertes par Asahara et al. ne participaient pas directement à la formation de néo-vaisseaux et à la réparation de ceux lésés, mais plutôt indirectement via la libération de facteurs paracrines (Rehman et al. 2003). **Les travaux de ces dernières années ont permis de clarifier la définition des PEC même s'il n'existe toujours pas de consensus.** Les PEC peuvent tout de même être divisés en deux grandes catégories : les PEC au **phénotype hématopoïétique** et les PEC au **phénotype endothélial** (Yoder 2013) (Yoder et al. 2007).

2. Différents types de PEC

Etant donné que les marqueurs utilisés pour identifier les PEC sont co-exprimés à la fois par les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques, plusieurs auteurs ont tenté d'établir la distinction entre les différents types de PEC sur la base de la méthode d'isolement (Figure 40) plutôt que sur la base de marqueurs de surface (Yoder 2013) (Medina et al. 2017) (Madonna et De Caterina 2015) :

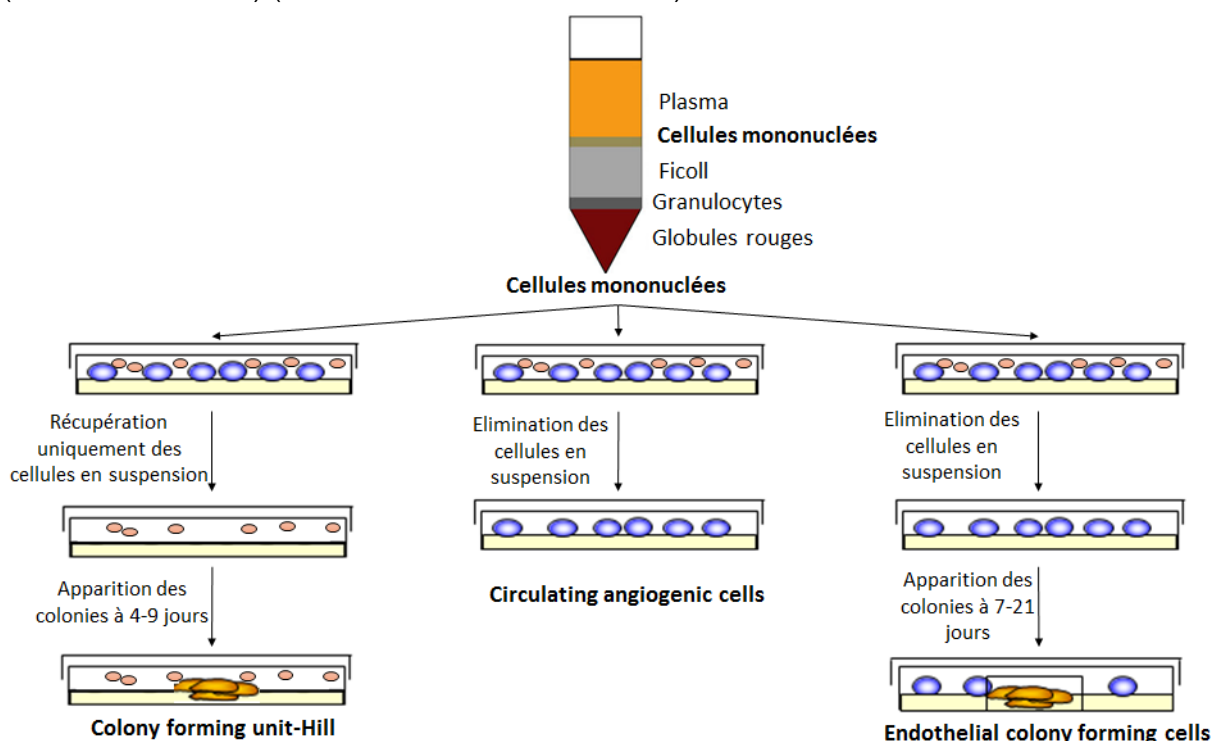


Figure 40 : Méthodes d'isolement des PEC. Ces 3 méthodes d'isolement permettent de donner des CFU-Hill, CAC et ECFC décrit ci-dessous. Adaptée de (Loisel, Provost, Haddad, et al. 2018).

- (1) Les « **Colony Forming Unit-Hill** » (**CFU-Hill**) sont isolées en ensemençant les cellules mononucléées sur une matrice de fibronectine en présence de facteurs de croissance pendant 1-2 jours. Les cellules en suspension sont ensuite récupérées et réensemencées. Des colonies avec des cellules en forme d'aiguille apparaissent au bout de 4-9 jours. Elles ont la même expression génique que les « circulating angiogenic cells » ou les monocytes en culture mais sont différentes des cellules endothéliales. Elles ont un faible potentiel prolifératif. Il s'agirait plutôt d'un mix de cellules sanguines hématopoïétiques.

(2) Les « **Circulating Angiogenic Cells** » (**CAC**) sont isolées en ensemençant les cellules mononuclées sur une matrice de fibronectine en présence de facteurs de croissance pendant 5-7 jours. Avec cette technique, la culture peut être contaminée avec des plaquettes et des monocytes.

Ces 2 premiers types de PEC font partie de la catégorie des « **early endothelial progenitor cells** » ou PEC précoces, qui exercent leur potentiel pro-angiogénique uniquement via la libération de facteurs paracrines et qui sont issus de la lignée hématopoïétique. Dans certaines revues ils sont nommés **cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques**.

(3) Les « **Endothelial Colony Forming Cells** » (**ECFC**) sont isolées en ensemençant les cellules mononuclées sur une matrice de collagène en présence de facteurs de croissance. Au bout de 2-3 semaines, il y a apparition de colonies de cellules à la forme pavimenteuse. Elles expriment les marqueurs des cellules endothéliales et sont capables de former des structures capillaires.

Les ECFC ont la dénomination « **late endothelial progenitor cells** » ou PEC tardifs et sont considérés comme étant des « vrais » PEC car ils donnent naissance *in vitro* à des colonies de cellules endothéliales (Ingram et al. 2004) et ont la capacité de former des vaisseaux *in vivo*. Ils exercent leur activité pro-angiogénique en s'intégrant directement aux vaisseaux lésés et en libérant des facteurs paracrines. Ils sont aussi capables de former des vaisseaux *de novo*. Contrairement aux cellules présentées précédemment, celles-ci sont issues de la lignée endothéliales.

Caractéristiques	PEC précoces CAC, CFU-Hill	PEC tardifs ECFC, OEC
Morphologie	Cellules en aiguilles	Cellules pavimenteuses
Phénotype	Hématopoïétique / monocytaire	Endothélial
Marqueurs en culture	CD34+, CD31+, KDR+, vWf+, Tie-2+, UEA-1+, CD45+ , CD14+, AC133+, CD146-, eNOS+/-, CD144+/-	CD34+, CD31+, KDR+, vWF+, Tie-2+, UEA-1+, CD45- , CD14-, AC133-, CD146+, eNOS+, CD144+
Potentiel prolifératif	Faible, sécrétion de facteurs paracrines	Elevé, différenciation en cellules endothéliales matures
Incorporation de LDL acétylé	Oui	Oui
Formation d'un réseau en Matrigel	Non	Oui
Sécrétion de cytokines proangiogéniques	Oui	Oui
Intégration au niveau du site ischémié	Non	Péri et intra-vasculaire

Tableau 4 : Bilan des caractéristiques des PEC précoces et tardifs. Adapté de (Yoon et al. 2005) et basé sur l'études des revues (Yoder 2013) (Medina et al. 2017) (Madonna et De Caterina 2015) .

3. Origine des PEC

Les progéniteurs hématopoïétiques et les progéniteurs endothéliaux ont une origine embryonnaire commune. De fait, si les progéniteurs hématopoïétiques proviennent de la moelle osseuse, alors, par analogie, il devrait en être autant des progéniteurs endothéliaux. Suite à la découverte des PEC, plusieurs études ont montré que ces cellules étaient issues de la moelle osseuse (Takahashi et al. 1999) (Shi et al. 1998). Cependant, ces études sont basées sur des CFU-Hill ou sur des populations cellulaires hétérogènes mal caractérisées. Par la suite, avec l'amélioration des techniques, il a été observé que les cellules identifiées étaient en fait des cellules hématopoïétiques de provenance médullaire ayant migré dans la zone péri-vasculaire des vaisseaux, mais qui ne participaient pas directement à l'angiogenèse (Okuno et al. 2011). Suite à la remise en cause de l'origine médullaire des PEC, l'idée qu'ils seraient présents au sein même des vaisseaux s'est développée.

Ingram et al. plaident en faveur de cette hypothèse. Ils ont mis au point une méthode d'isolement « single-cell » (Ingram et al. 2004) qui a permis de mettre en évidence la présence de cellules dites « LPP-ECFC » (Low Proliferative Potential) et « HPP-ECFC » (High Proliferative Potential) au sein des ECFC isolés à partir de SCO et de sang adulte. Les

« single cell » capables de donner naissance à une colonie composée de 50-200 cellules sont nommées « LPP-ECFC » et celles donnant des colonies de plus de 2000 cellules, des « HPP-ECFC » (Ingram et al. 2004). Les HPP-ECFC sont les seules capables de générer de nouvelles colonies suite à des réensemencements successifs. L'application de cette méthode « single cell » à des cellules endothéliales de la paroi vasculaire du cordon (HUVEC) et de la paroi des artères (HAEC), supposées être des cellules endothéliales matures, a montré l'existence de « LPP-ECFC » et « HPP-ECFC » au sein de ces parois vasculaires (Ingram et al. 2005). Il existerait donc une hiérarchie de progéniteurs endothéliaux, qui résident au sein même de l'endothélium de la paroi vasculaire : les progéniteurs endothéliaux « HPP » et « LPP » et les cellules endothéliales matures (David P. Basile et Yoder 2014). On retrouverait donc des ECFC simultanément dans la paroi des vaisseaux et en petite quantité dans la circulation.

4. Angiogenèse et réparation des tissus vasculaires lésés

Lors d'une lésion ou d'un remodelage vasculaire, il semblerait qu'il y ait une coopération entre les cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques (PEC précoces) et les ECFC (PEC tardifs). L'hypothèse, émise par Basile et al., propose que les cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques migrent rapidement au site de la lésion ([Figure 41](#)) ou du remodelage ([Figure 42](#)) vasculaire pour créer un environnement pro-angiogénique. La sécrétion de facteurs paracrines par ces cellules permet de recruter les ECFC, provenant de la circulation et/ou de la paroi vasculaire, migrant et proliférant au site de la lésion/remodelage. Les ECFC participent à l'angiogenèse et à la réparation du tissu lésé directement et indirectement en sécrétant aussi des facteurs paracrines. Il y a ainsi réparation vasculaire dans le cas d'une lésion et angiogenèse lors d'un remodelage vasculaire (D. P. Basile, Collett, et Yoder 2018) (David P. Basile et Yoder 2014). La co-transplantation de cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques et d'ECFC a montré une néo-angiogenèse *in vivo* supérieure à celle engendrée par les deux types cellulaires administrés séparément (Yoon et al. 2005). Cette observation permet de supporter l'hypothèse d'un remodelage vasculaire induit par la coordination de ces deux types cellulaires.

Vu sous cette perspective, le degré de remodelage vasculaire stimulé par les cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques est dépendant, d'une part, du potentiel prolifératif des ECFC résidant dans le tissu et d'autre part de la quantité d'ECFC circulants qui peuvent être recrutés au niveau du tissu. Si cette hypothèse est vérifiée, il doit y avoir une corrélation entre le contenu en ECFC et la capacité angiogénique d'un lit vasculaire spécifique.

Une étude réalisée chez le rat a comparé le potentiel prolifératif des cellules endothéliales de la microvasculature pulmonaire et des artères pulmonaires. Il a été observé que la majorité des cellules endothéliales de l'artère ne se divisent pas quand, au contraire, la majorité de cellules endothéliales microvasculaires se divisent et forment des colonies de taille importante (supérieures à 2000 cellules, définies comme « HPP-ECFC » par Ingram). La différence de capacité proliférative entre les deux types de cellules endothéliales est due au fait que les cellules endothéliales microvasculaires contiennent plus de HPP-ECFC (Alvarez et al. 2008). Si cette hypothèse se vérifie, un tissu avec une faible capacité de réparation vasculaire devrait être épuisé en HPP-ECFC. C'est le cas du système vasculaire rénal. La difficulté de faire pousser des cellules endothéliales rénales *in vitro* est connue, car elles ne prolifèrent pas ou peu. 90% d'entre elles ne se divisent pas et aucune sous-population ne peut être définie comme HPP-ECFC dans la paroi de l'endothélium rénal (David P. Basile et Yoder 2014). Ceci semble confirmer l'importance des ECFC pour la réparation vasculaire et l'angiogenèse.

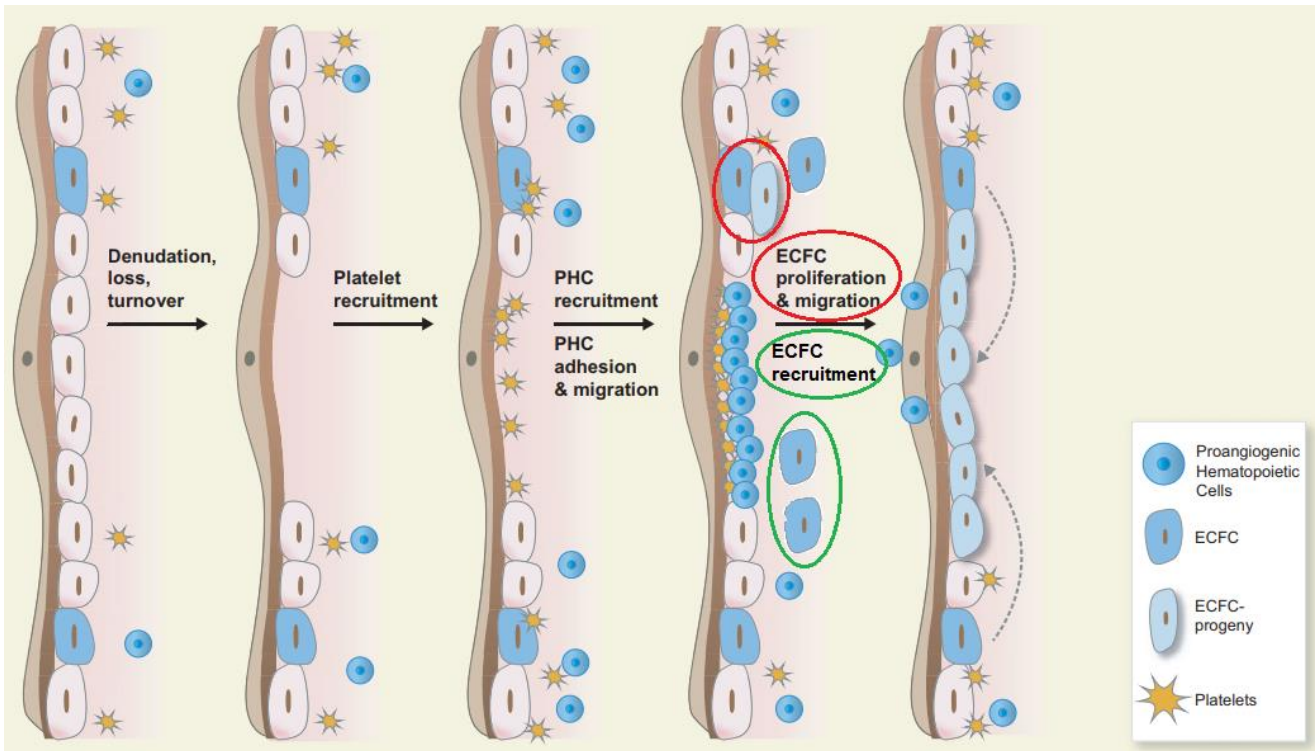


Figure 41 : Synergie des cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques et des ECFC pour la réparation tissulaire suite à une lésion vasculaire. Dans un premier temps les plaquettes sont recrutées, elles vont être suivies par les cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques qui vont sécréter des facteurs paracrines. Ceci permet la prolifération et la migration des ECFC présents dans la paroi vasculaire et le recrutement de ceux présents dans la circulation. La lésion est ainsi réparée. Adaptée de Basile Collett Yoder 2018 (D. P. Basile, Collett, et Yoder 2018).

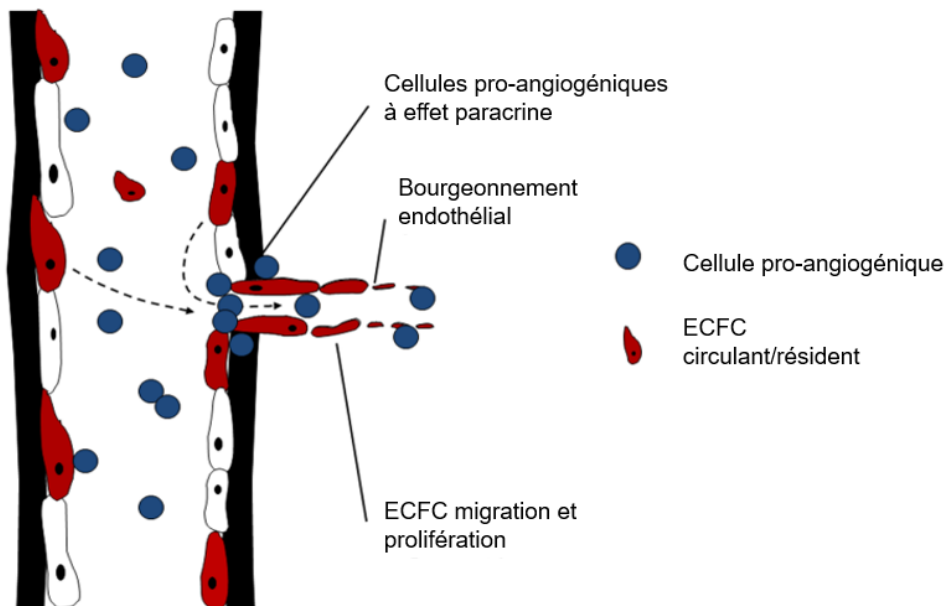


Figure 42 : Synergie des cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques et des ECFC pour l'angiogénèse. Les cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques sont recrutées au site de l'ischémie et sécrètent des facteurs paracrines pour recruter les ECFC circulants et résidents. Adaptée de (David P. Basile et Yoder 2014).

Mes travaux de thèse sont centrés sur l'utilisation des ECFC en tant que thérapie cellulaire. La suite de ce chapitre leur sera donc consacrée. Pour rappel, dans l'HTP, le VD défaillant présente une diminution de la densité capillaire, donc un défaut de l'angiogenèse. C'est donc la capacité des ECFC à participer à l'angiogenèse et à la stimuler qui nous intéresse dans ce travail de thèse.

II. Endothelial Colony Forming Cells

Etant donné qu'il n'est pas possible d'isoler cette population cellulaire sur la seule base de l'expression de marqueurs de surface, les ECFC sont caractérisés sur la base de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles.

1. Caractéristiques phénotypiques

Les ECFC ont pour caractéristique de former des colonies de cellules à la morphologie pavimenteuse. De plus, comme décrit dans le Tableau 4, les ECFC expriment une combinaison de marqueurs à leur surface. L'absence d'expression de certains marqueurs tels que le CD45 et le CD14 est importante car elle permet de vérifier l'exclusion des cellules d'origine hématopoïétique. L'expression ou la non-expression de ces marqueurs est vérifiée par cytométrie en flux (Figure 43 A) ou par imagerie à fluorescence.

2. Caractéristiques fonctionnelles

Les ECFC ont pour caractéristique de pouvoir reproduire les fonctions des cellules endothéliales. Afin de vérifier si c'est le cas, plusieurs techniques *in vitro* ont été mises au point pour caractériser les ECFC.

Comme les cellules endothéliales, les ECFC sont à même d'internaliser le LDL-acétylé. Cette propriété est testée *in vitro* en utilisant du LDL-acétylé couplé à un fluorochrome ajouté dans le milieu de culture (Figure 43 B).

Une des techniques pour tester leurs capacités angiogéniques est l'ensemencement des cellules isolées sur une matrice extracellulaire riche en facteurs pro-angiogéniques

(Matrigel™). Après quelques heures elles sont censées former un réseau tubulaire (Figure 43 C).

Leur capacité migratoire en présence d'un chemo-attractant (VEGF) est testée à l'aide d'une chambre de Boyden : il s'agit d'un insert de culture dont le fond est poreux, les cellulesensemencées sur cette face vont alors être attirées vers le compartiment contenant le chemo-attractant et migrer de la face supérieure de la membrane vers la face inférieure en passant à travers les pores. Le décompte des cellules ayant traversé la membrane va permettre d'observer si les cellules isolées peuvent migrer en réponse au chemo-attractant comme dans le cas d'une lésion vasculaire (Figure 43 D). Un autre test de migration/prolifération consiste à effectuer une « blessure » au sein de la monocouche d'ECFC en culture et d'analyser le temps que mettent les cellules à fermer cette blessure par les cellules en vidéo-microscopie (Figure 43 E).

La capacité d'exprimer les molécules d'adhérence InterCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) et Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), impliquées dans le recrutement leucocytaire lors de la réponse inflammatoire, est analysée *in vitro* en incubant les cellules avec du Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) (cytokine pro-inflammatoire). L'expression de ces molécules d'adhérence est vérifiée par cytométrie en flux (Figure 43 F).

Les ECFC ont aussi la capacité de proliférer. Il a été montré dans le laboratoire que les ECFC issus de sang de cordon (Bompais et al. 2004) ont un potentiel prolifératif et clonal plus important que ceux issus de sang périphérique adulte (Ferratge et al. 2017).

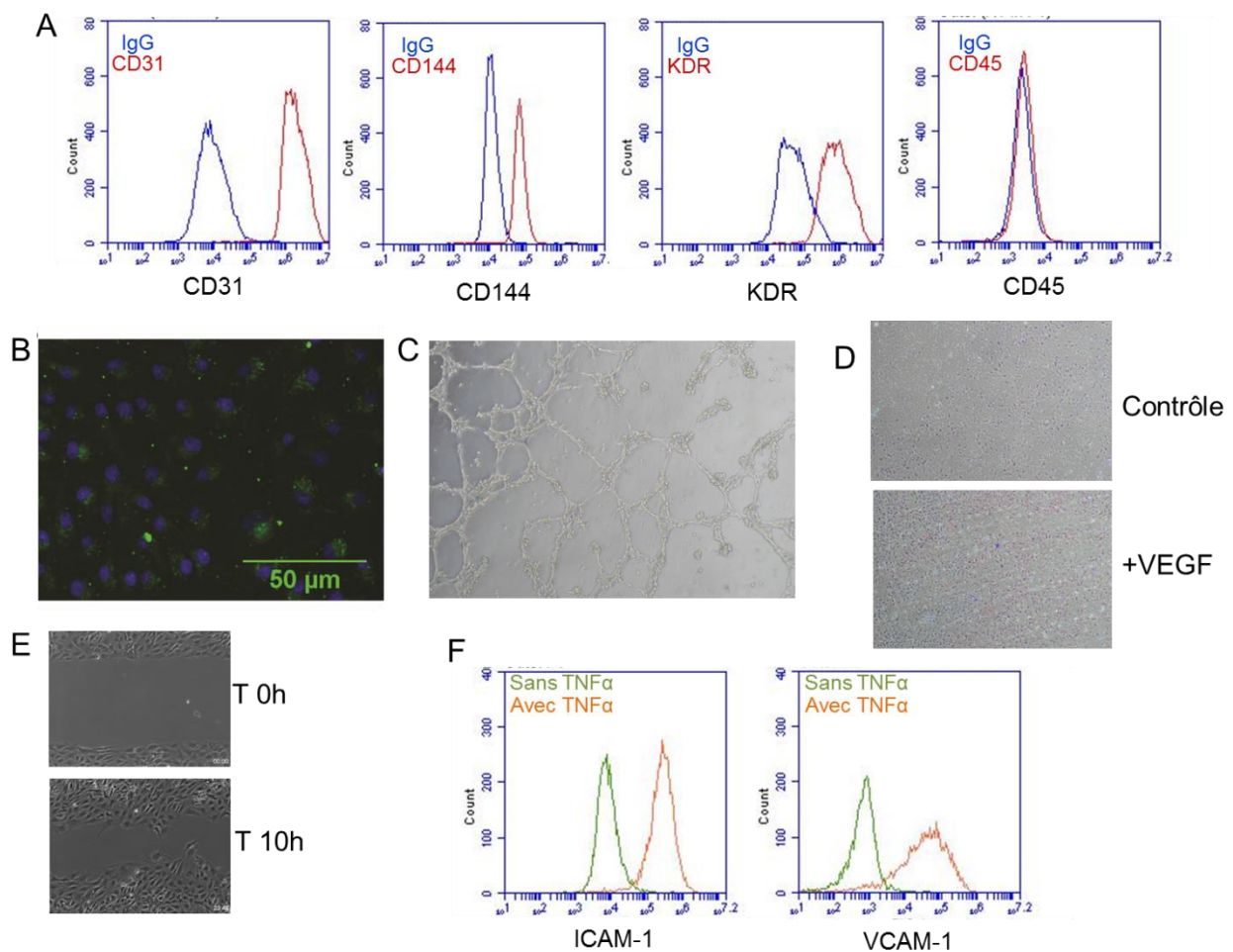


Figure 43 : Tests classiques pour la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des ECFC. A : Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs membranaire CD31, CD144, KDR et CD45. B : Incorporation du LDL-acétylé par les ECFC. C : Formation de réseau par les ECFC en culture sur du Matrigel® pendant 12h. D : Migration des ECFC pour la fermeture de blessure. E : Migration des ECFC par chimiotactisme en réponse à du VEGF. F : Expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 en réponse à un stimulus inflammatoire (TNF α).

3. Potentiel thérapeutique des ECFC pour les pathologies cardiaques

Il est important de bien comprendre qu'à ce jour il n'existe pas de consensus sur la définition des PEC. Ceci rend complexe l'analyse des études réalisées *in vivo*, où des « PEC » ont été administrés à des modèles animaux de dysfonction cardiaque. Cette partie récapitule brièvement les avancées quant à l'utilisation des PEC en thérapie cellulaire.

a. Administration de cellules

Wang et al. ont administré des PEC autologues en intraveineux chez des patients atteints d'HTAP idiopathique. Il a été observé une augmentation de la distance parcourue en 6

minutes et une amélioration de l'hémodynamique pulmonaire (X.-X. Wang et al. 2007). Suite à ces résultats encourageants, le même groupe a étudié l'administration intraveineuse de PEC autologues chez des enfants atteints d'HTAP idiopathique et a observé les mêmes résultats : augmentation de la distance parcourue en 6 minutes, diminution de la PAPm, diminution des RVP et augmentation du débit cardiaque (Zhu et al. 2008). D'après le protocole d'isolement et de culture des cellules administrées au cours de ces deux essais cliniques, il semblerait que ce soit des PEC précoces qui aient été injectés.

Doyle et al. ont administré des PEC autologues en intracoronaire dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde. Il a été observé une hypertrophie de la zone infarctée associée à une amélioration de la fonction du VG. Malgré le manque d'information, il semblerait ici également que ce soit des PEC précoces qui aient été injectés (Doyle et al. 2008). Les PEC ont aussi été administrés par voie intracardiaque. L'injection intramyocardique de PEC, dérivés de sang de cordon humain, en bordure de la zone infarctée du cœur d'un modèle de rat d'infarctus, a montré une diminution de la fibrose et une augmentation de la densité capillaire (Hu et al. 2010). L'administration intra-épicardique de PEC autologues a été étudiée dans un modèle porcin d'infarctus. Quatre semaines après l'administration, la densité capillaire et la fonction systolique du VG étaient améliorées (Kawamoto et al. 2003).

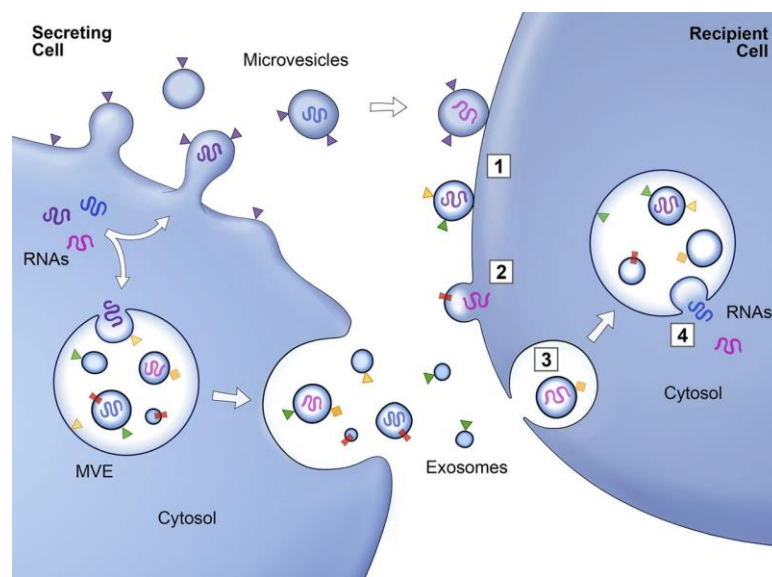
b. Administration de milieu conditionné

L'équipe de Doyle a aussi évalué l'administration de milieu conditionné de PEC dans ce même modèle porcin d'infarctus. L'administration du milieu ayant été en contact avec les PEC pendant 48h a montré des effets similaires à ceux observés avec l'administration des PEC ; c'est-à-dire, une hypertrophie de la zone infarctée associée à une amélioration de la fonction du VG (Doyle et al. 2008). L'administration de milieu conditionné de PEC dans un modèle porcin d'infarctus a été réitérée par Hynes et al.. La méthode de production du milieu conditionné est identique à celle utilisée par Doyle et al.. Cette étude, plus détaillée que la précédente, a permis de montrer une diminution de la surface de la zone infarctée, une augmentation de l'angiogenèse et de l'hypertrophie des cardiomyocytes présents dans cette

zone ainsi qu'une amélioration de la fonction du VG. D'après cette étude, la présence d' « Insulin Growth Factor-1 » dans le milieu de culture constitue la cause du remodelage cardiaque bénéfique observé (Hynes et al. 2013).

Depuis ces études, les méthodes pour analyser le sécrétome des PEC se sont développées (J. Wang, Guo, et al. 2016) (J. Wang, Zhong, et al. 2016) et l'administration de microvésicules et d'exosomes de PEC ont été étudiées dans quelques modèles. Les microvésicules (100 nm à 1 µm) sont relarguées par la surface cellulaire et peuvent transporter des ARNm et des microARN. Les exosomes (40 à 100 nm) quant à eux sont des particules issues des corps multivésiculaires, capables de transférer des protéines et des ARN (Figure 44) (Raposo et

Stoorvogel 2013).



(Raposo et

Figure 44 : Schéma représentant la sécrétion de microvésicules et d'exosomes par une cellule. Les ARN sont incorporés dans les endosomes multi-vésiculaires (MVE) ou dans les microvésicules qui bourgeonnent à la surface de la cellule. Les MVE fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leurs exosomes dans le milieu extracellulaire. Les microvésicules et les exosomes peuvent se fixer à la membrane plasmique (1), elles peuvent fusionner avec la membrane (2) ou être endocytés (3) par la cellule cible. Les vésicules endocytées peuvent fusionner avec la membrane du compartiment endocytique de la cellule cible (4). Les 2 voies aboutissent au relarguage de protéines ou d'ARN dans le cytosol de la cellule cible. Issue de (Raposo et Stoorvogel 2013).

Plusieurs études ont montré que les microvésicules dérivées des PEC permettaient de protéger le rein de l'ischémie reperfusion (Bitzer, Ben-Dov, et Thum 2012). L'administration de microvésicules de PEC engendre une augmentation de la densité capillaire dans un

modèle murin d'ischémie des membres inférieurs (Ranghino et al. 2012). D'autre part, l'administration d'exosomes en sous-cutané dans un modèle de lésion chez le rat a montré une accélération de la cicatrisation (Li, Jiang, et Zhao 2016). A ma connaissance, il n'y a pas d'étude portant sur l'administration de microvésicules ou d'exosomes, préalablement isolés du milieu conditionné, de PEC dans un modèle animal d'insuffisance cardiaque.

c. Administration via biomatériaux

Plusieurs types de matrices ont été utilisés pour délivrer les PEC au tissu cardiaque. L'injection d'un hydrogel de fibrine contenant des PEC permet d'augmenter l'angiogenèse et de diminuer la fibrose dans un modèle d'infarctus du myocarde. Dans cette étude, la migration des PEC du patch vers le myocarde permet d'augmenter la densité capillaire et induit une amélioration de la fonction cardiaque (Atluri et al. 2014). Un autre type d'hydrogel, composé d'acide hyaluronique et contenant des PEC, a été administré dans un modèle d'ischémie du myocarde et a montré les mêmes bénéfices que précédemment. Cependant, il est important de prendre en compte que dans ces deux cas, l'injection du produit de thérapie cellulaire a été effectuée dans la foulée de la mise en place du modèle. De plus, les PEC utilisés dérivait de la moelle osseuse, il s'agirait donc de PEC précoces. L'administration de PEC, associés à d'autres types cellulaires, sous la forme de feuillets cellulaires a aussi été étudiée. L'implantation d'un feuillet de fibroblastes, sur lequel sontensemencés des PEC, sur le cœur d'un modèle d'infarctus entraîne une diminution de la formation de tissu fibreux et une augmentation de la densité capillaire (Kobayashi et al. 2008). A ce jour et à ma connaissance, il n'existe pas d'essai clinique ayant pour but d'administrer des PEC via l'utilisation de matrices dans une pathologie cardiaque.

Objectifs et hypothèses

L'HTP est une pathologie rare et grave caractérisée par une obstruction artérielle pulmonaire entraînant une augmentation des RVP et qui aboutit à une insuffisance cardiaque droite. Face à la surcharge de pression, le VD va dans un premier temps s'adapter puis, au fur et à mesure se désadapter et donc devenir défaillant. Dans cette pathologie, c'est le VD défaillant qui conditionne la survie des patients. La transition de son état adapté à désadapté est caractérisée par l'apparition d'une ischémie. A cause de l'hypertrophie, le myocarde du VD est moins bien irrigué par l'artère coronaire droite, surtout en systole. Au niveau cellulaire, une raréfaction capillaire est observée. L'apport en oxygène au VD est donc diminué par rapport au travail qui lui est demandé.

La thérapie cellulaire est largement développée pour le VG mais beaucoup moins pour le VD, surtout dans le cas de l'HTP. Le VD étant crucial pour la survie des patients atteints de cette pathologie, nous avons tenté de développer une thérapie cellulaire agissant sur l'ischémie du VD en HTP.

Nous avons fait le choix de traiter la dysfonction du VD à l'aide d'une thérapie cellulaire ciblant l'angiogenèse car nous pensons que la raréfaction capillaire est une cause de la dysfonction du VD et non une conséquence de celle-ci. Nous posons l'hypothèse que la « reperfusion » du VD grâce à une thérapie cellulaire pro-angiogénique pourrait améliorer sa fonction et ainsi augmenter l'espérance de vie des patients atteints d'HTP.

Le laboratoire de l'hôpital Marie Lannelongue a développé un modèle porcin d'HPPE, un sous-type d'HTP. Ce modèle est le seul modèle gros animal reproduisant les défaillances observées dans le cas de l'HTP chez l'homme : augmentation des pressions et des résistances pulmonaires et dyfonction cardiaque droite. Ce modèle peut être établi relativement rapidement et de manière stable. Le laboratoire de l'hôpital Paul Brousse possède quant à lui les compétences pour isoler et caractériser les progéniteurs endothéliaux, et plus précisément les ECFC, qui sont connus pour leurs capacités pro-angiogéniques. Au cours de ce projet, nous avons choisi de réaliser des transplantations

autologues afin d'éviter le risque de rejet : les cellules sont dans un premier temps isolées à partir d'un échantillon sanguin du porc et ré-administrées à ce même porc une fois la pathologie établie. Pour rappel, les ECFC font partis du grand groupe des PEC. Ce sont des ECFC que nous avons utilisé comme produit de thérapie cellulaire pendant cette thèse, c'est donc ce terme qui sera utilisé lors de la présentation des résultats.

Notre hypothèse est que l'administration d'ECFC dans le VD d'un modèle d'HTP induit l'amélioration de la fonction ventriculaire droite.

Pour tester cette hypothèse, l'objectif était d'étudier la faisabilité et l'effet de l'administration des progéniteurs endothéliaux dans le VD par différentes voies d'administration. Le travail s'est donc divisé en plusieurs sous objectifs :

- ❖ Etudier l'effet de l'administration des progéniteurs endothéliaux dans le VD, via l'artère coronaire droite, sur l'hémodynamique pulmonaire et cardiaque. Evaluer aussi les effets au niveau du tissu cardiaque : rétention des cellules, hypertrophie, fibrose...
- ❖ Etudier l'effet de l'administration des progéniteurs endothéliaux en intracardiaque, directement dans le VD. De même que précédemment, évaluer les effets au niveau cellulaire : rétention des cellules, hypertrophie, fibrose... et les comparer à l'administration intracoronaire.
- ❖ Etudier la faisabilité de la pose d'un patch constitué de polysaccharides contenant les progéniteurs endothéliaux sur le VD.
- ❖ Etudier l'effet des progéniteurs endothéliaux sur les cardiomyocytes *in vitro*.

Résultats

Article n°1 : L'administration autologue de progéniteurs endothéliaux circulants améliore la fonction ventriculaire droite dans un modèle d'hypertension pulmonaire post embolique.

Accepté dans Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery

Introduction

La dysfonction du VD est le principal facteur de pronostic dans l'HTP. Il a été reporté que la diminution de la densité capillaire du VD caractérise le passage d'un VD adapté à un VD désadapté et donc défaillant. A ce jour, il n'existe pas de thérapie cellulaire ciblant le VD en surcharge de pression. Les ECFC favorisent la réparation vasculaire et l'angiogenèse mais n'ont pas encore été étudiées en tant que thérapie cellulaire ciblant le VD en HTP.

Hypothèse

L'administration d'ECFC dans un modèle porcin d'HPPE pourrait améliorer la densité capillaire et la fonction du VD.

Méthodes

Une étude préliminaire a été réalisée afin d'estimer la rétention cellulaire après l'administration intracoronaire des ECFC. Pour ce faire 2 porcs ont sacrifiés respectivement 4h et 24h après l'administration. Nous avons ensuite comparé 3 groupes : contrôle (n=5), HPPE (n=6) et HPPE+ECFC (n=5). Les ECFC ont été isolés à partir du sang périphérique des porcs du groupe HPPE+ECFC au cours de leur modélisation pour une administration autologue. Le groupe contrôle a reçu du sérum physiologique administré par voie intracoronaire droite. Après la mise en place du modèle d'HPPE, les groupes HPPE et HPPE+ECFC ont reçu respectivement du sérum physiologique et des ECFC par voie intracoronaire droite. L'hémodynamique pulmonaire et la fonction du VD ont été évaluées avant l'injection et quatre semaines plus tard. Les porcs ont été mis à mort quatre semaines après l'administration et des biopsies cardiaques et pulmonaires ont été récupérées pour

être analysées. Etant donné que la fonctionnalité des ECFC peut être affectée par la mise en place de la pathologie, leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles ont été étudiées avant et après l'HPPE.

Résultats

L'étude préliminaire a permis de retrouver les ECFC injectés dans le VD à 4h et 24h après leur administration mais pas à quatre semaines.

Quatre semaines après l'administration des ECFC, la comparaison des groupes HPPE et HPPE+ECFC a révélé une augmentation du RVFAC dans le groupe ayant reçu les cellules. Les autres paramètres hémodynamiques, cardiaque ou pulmonaire, n'ont pas été retrouvés différents entre les groupes HPPE et HPPE+ECFC. L'expression du CD31, marqueur de la densité capillaire, a été retrouvée augmentée après l'administration des ECFC. De manière intéressante, la surface des cardiomyocytes est diminuée dans le groupe HPPE+ECFC.

L'évaluation des ECFC avant et après l'HPPE n'a pas révélée de différence concernant l'expression de marqueurs endothéliaux, l'internalisation du LDL-acétylé, la fermeture d'une blessure et la prolifération. Le phénotype de ces cellules ne semble ainsi pas avoir été affecté par la modélisation HPPE.

Conclusion

Nous avons démontré l'innocuité et la faisabilité de l'administration d'ECFC autologues par voie intracoronaire dans un modèle porcin d'HTP. L'administration d'ECFC a permis d'améliorer la fonction du VD, sa densité capillaire et de diminuer son hypertrophie. La thérapie cellulaire composée d'ECFC semble être prometteuse pour le maintien de la fonction du VD en HTP.

Autologous endothelial progenitor cell therapy improves right ventricular function in a model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension



Fanny Loisel, MSc,^{a,b} Bastien Provost, MD, MSc,^a Julien Guihaire, MD, PhD,^{a,c} David Boulate, MD,^{a,d} Nassim Arouche, Eng,^b Myriam Amsallem, MD,^a Jennifer Arthur-Ataam, PhD,^a Benoît Decante, MSc,^a Peter Dorfmueller, MD, PhD,^{a,e} Elie Fadel, MD, PhD,^{a,d,f} Georges Uzan, PhD,^b and Olaf Mercier, MD, PhD^{a,d,f}

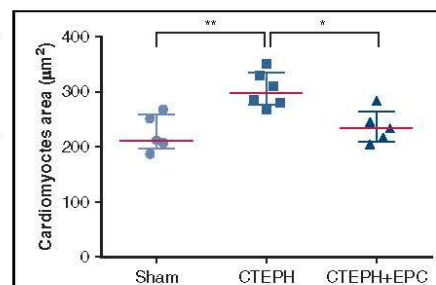
ABSTRACT

Background: Right ventricular (RV) failure is the main prognostic factor in pulmonary hypertension, and ventricular capillary density (CD) has been reported to be a marker of RV maladaptive remodeling and failure. Our aim was to determine whether right intracoronary endothelial progenitor cell (EPC) infusion can improve RV function and CD in a piglet model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH).

Methods: We compared 3 groups: sham (n = 5), CTEPH (n = 6), and CTEPH with EPC infusion (CTEPH+EPC; n = 5). After EPC isolation from CTEPH+EPC piglet peripheral blood samples at 3 weeks, the CTEPH and sham groups underwent right intracoronary infusion of saline, and the CTEPH+EPC group received EPCs at 6 weeks. RV function, pulmonary hemodynamics, and myocardial morphometry were investigated in the animals at 10 weeks.

Results: After EPC administration, the RV fractional area change increased from 32.75% (interquartile range [IQR], 29.5%-36.5%) to 39% (IQR, 37.25%-46.50%; *P* = .030). The CTEPH+EPC piglets had reduced cardiomyocyte surface areas (from 298.3 μm^2 [IQR, 277.4-335.3 μm^2] to 234.6 μm^2 (IQR, 211.1-264.7 μm^2 ; *P* = .017), and increased CD31 expression (from 3.12 [IQR, 1.27-5.09] to 7.14 [IQR, 5.56-8.41; *P* = .017). EPCs were found in the RV free wall at 4 and 24 hours after injection but not 4 weeks later.

Conclusions: Intracoronary infusion of EPC improved RV function and CD in a piglet model of CTEPH. This novel cell-based therapy might represent a promising RV-targeted treatment in patients with pulmonary hypertension. (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2019;157:655-66)



Decreased cardiomyocyte surface area after right intracoronary administration of endothelial progenitor cells in a chronic thromboembolic pulmonary hypertension pig model.

Central Message

Coronary infusion of autologous endothelial progenitor cells improved right ventricle adaptation to pulmonary hypertension in an animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

Perspective

Pulmonary hypertension is a life-threatening disease that leads to right ventricle failure. To date, pharmacological advances have targeted the pulmonary circulation. We report that right ventricle-targeted cell therapy might hold promise in supporting right ventricular function in a model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

See Editorial Commentary page 667.

From the ^aResearch and Innovation Unit, Inserm UMR-S 999, ^bDepartment of Cardiac Surgery, ^cDepartment of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital, ^dDepartment of Pathology, ^eInserm 1197 Research Unit, Univ Paris Sud, Paris-Saclay University, Le Plessis Robinson, France; and ^fParis-Sud University and Paris-Saclay University, School of Medicine, Kremlin-Bicêtre, France.

This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency as part of the second "Investissement d'Avenir" program (reference: ANR-15-RHUS-0002).

Drs Loisel and Provost contributed equally to this work.

Received for publication Feb 11, 2018; revisions received July 31, 2018; accepted for publication Aug 1, 2018.

Address for reprints: Olaf Mercier, MD, PhD, Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Research and Innovation Unit, Marie Lannelongue Hospital, 133 Ave de la Resistance, 92350 Le Plessis Robinson, France (E-mail: o.mercier@ccml.fr).

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2018 by The American Association for Thoracic Surgery

<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.08.083>

Abbreviations and Acronyms

Ac-LDL	= acetylated low-density lipoprotein
BrdU	= bromodeoxyuridine
CTEPH	= chronic thromboembolic pulmonary hypertension
CTEPH+EPC	= chronic thromboembolic pulmonary hypertension with endothelial progenitor cell infusion
Ea	= arterial elastance
Ees	= end-systolic elastance
EPC	= endothelial progenitor cell
GAPDH	= glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	= green fluorescent protein
IGF	= insulin growth factor
IQR	= interquartile range
MHC	= myosin heavy chain
mPAP	= mean pulmonary artery pressure
PA	= pulmonary artery
PBS	= phosphate-buffered saline
PFA	= paraformaldehyde
PH	= pulmonary hypertension
RUL	= right upper lobe
RV	= right ventricular
RVFAC	= right ventricular fractional area change
T0	= baseline
T6	= 6 weeks
T10	= 10 weeks
TAPSE	= tricuspid annular plane systolic excursion
TPR	= total pulmonary resistance
VEGF	= vascular endothelial growth factor



Scanning this QR code will take you to the article title page to access supplementary information.



Right ventricular (RV) function is the main prognostic factor in pulmonary hypertension (PH).¹ Increased pulmonary vascular resistance induces RV remodeling from an adaptive to a maladaptive phenotype as the disease progresses. Unlike adaptive remodeling, maladaptive RV remodeling is characterized by dilatation, reduced cardiac output, ventriculoarterial uncoupling, and a high mortality rate. At the cellular level, maladaptive remodeling is associated with reduced angiogenesis, increased fibrosis, metabolic

changes, and a dysregulation of the autonomic nervous system.^{2,3} The transition from adaptive to maladaptive RV remodeling is a continuum that ultimately leads to end-stage heart failure.

A decrease in ventricular capillary density occurs in various animal models of PH^{4,5} and in humans at the stage of maladaptive remodeling or heart failure.⁶ Indeed, RV ischemia has been described by Gómez and colleagues in the setting of chronic PH.⁷ To date, no cell-based therapy is available for the overloaded right ventricle. Therefore, endothelial progenitor cells (EPCs) might be good candidates for RV-targeted therapy because they can differentiate into specialized endothelial cells⁸ and they release paracrine factors involved in angiogenesis.⁹ EPCs have been reported to promote vascular repair and angiogenesis,¹⁰⁻¹² although they have not yet been investigated in PH.

Chronic thromboembolic PH (CTEPH) is characterized by chronic pulmonary vessel obstruction combined with severe distal vasculopathy.¹³ Our group developed a novel piglet model of CTEPH that has been validated for RV dysfunction and pulmonary vascular disease.^{14,15} We reported that ventricular-arterial uncoupling can be durably reversed when the RV afterload is normalized in this large-animal model.¹⁶ Moreover, the RV capillary density is impaired in long-term CTEPH animal models.¹⁷ Consequently, our aim was to investigate the effect of right intracoronary administration of EPCs on RV function and capillary density. Our hypothesis was that EPC would improve RV function by enhancing capillary density.

METHODS**CTEPH Model**

Five-week-old large white piglets, weighing 20-22 kg, were included in the preliminary (n = 2) and the main study (n = 16). The animals were randomly assigned to the sham or CTEPH group. To establish the CTEPH model, the piglets were first subjected to surgery under general anesthesia (propofol, isoflurane, and pancuronium) and mechanical ventilation, and they underwent a ligation of the left pulmonary artery (PA) through a left thoracotomy. Embolization of the right PA was then performed weekly over a 5-week period, via percutaneous access to the brachiocephalic vein, using cyanoacrylate glue (Histoacryl; B. Braun, Melsungen, Germany), to target the right lower lobe.¹⁴ Thus, ligation of the left PA, combined with selective occlusion of the distal arteries of the right lower lobe, gradually increased the pulmonary vascular resistance, thereby leading to RV dysfunction at 5 weeks. The animals in the sham group underwent a thoracotomy and weekly right PA saline injections over a 5-week period to mimic the embolization of the animals in the CTEPH group.

A preliminary pilot study was undertaken using 1 sham piglet in which GFP-labeled EPCs were administered at 6 weeks (T6), and the animal was sacrificed 4 hours later. One CTEPH piglet received GFP-labeled EPCs at T6 and it was sacrificed 24 hours later.

Sixteen piglets were included in the main study: 5 sham, 6 CTEPH, and 5 CTEPH+EPC (Figure 1, A). At T6, the animals in the sham and the CTEPH groups received a right intracoronary injection of saline, whereas the animals in the CTEPH+EPC group each received 16 ± 3.21 million

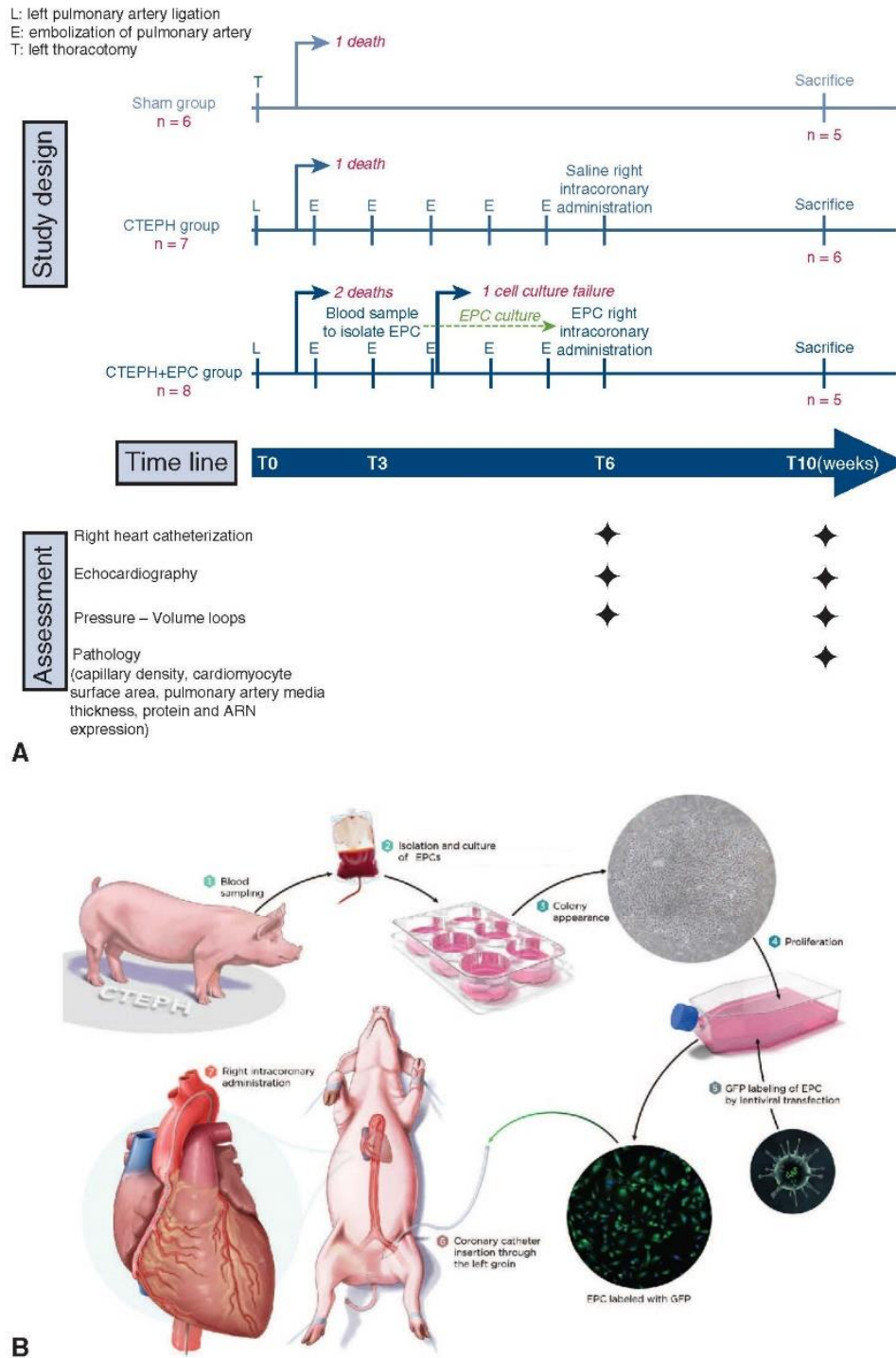


FIGURE 1. A, Study design. B, Study design for endothelial progenitor cell (EPC) administration in piglets of the chronic thromboembolic pulmonary hypertension and endothelial progenitor cell infusion (CTEPH+EPC) group. CTEPH, Chronic thromboembolic pulmonary hypertension; GFP, Green fluorescent protein.

GFP-labeled EPCs (an average of 6.5×10^4 EPC/kg; Figure 1, B). Animals entering the CTEPH procedure were randomly assigned to either the CTEPH or the CTEPH+EPC group at the time that the model was established, just before left PA ligation.

EPC Administration

Cell therapy administration was performed at T6 for the CTEPH+EPC group. This time point was chosen because it has been proven in the study of Mercier and colleagues that chronic PH is developed in pigs 5 weeks

print & web 4C/FFO



Insertion of a 4-French catheter through the right femoral artery

VIDEO 1. Description of the right intracoronary EPCs administration procedure in a piglet model of CTEPH. Video available at: [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(18\)32477-2/fulltext](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(18)32477-2/fulltext).

after left PA ligation and weekly embolization.¹⁴ EPC administration was performed under general anesthesia, using a 4-French catheter inserted through the femoral artery and an AR I mod catheter (Cordis, Hialeah, Fla) placed in the proximal right coronary artery, under fluoroscopic guidance. Proper positioning of the catheter was assessed using injection of contrast agent. Autologous EPCs were resuspended in 20 mL of saline solution in a syringe, and injected continuously through the catheter into the right coronary artery at a rate of 6.6 mL/min. Each piglet in the CTEPH+EPC group was injected with the maximum number of cells available after culturing for no more than 4 passages. For more details, refer to [Video 1](#).

Hemodynamic Assessment

The heart rate, the mean PA pressure (mPAP), cardiac output, and blood saturation were measured at baseline (T0), at T6, and at 10 weeks (T10). A pressure–volume loop analysis of the RV was performed at T6 and T10 with a conductance VentriCath 507 (Millar Instruments, Houston, Tex).

Echocardiographic Assessment

Transthoracic echocardiography (Vivid E9; GE Medical Systems, Milwaukee, Wis) was performed at T0, T6, and T10. Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), RV fractional area change (RVFAC), and the RV free wall strain were assessed.¹⁸ Measurements were analyzed by 2 blinded cardiologists.

Capillary Density Assessment in the Right Ventricle

To assess the capillary density, RV samples were incubated with a rabbit anti-human CD31 (CD31 clone 1A10; 1:100; Diagnostics, Blagnac, France) detected using ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Oro Valley, Ariz) staining with Benchmark GX (Roche, Boulogne-Billancourt, France). The capillary density was determined according to the number of capillaries per square millimeter in 5 fields of view for each animal at 400 \times magnification (NIS-Element software; Nikon, Tokyo, Japan).

Cardiomyocyte Surface Assessment in the Right Ventricle

Right ventricle samples were incubated with wheat germ agglutinin (WGA-AF488; Invitrogen, Carlsbad, Calif; 10 μ g/mL) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (1:10,000; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). The cardiomyocyte surface was determined, as previously described,¹⁹ using ImageJ software (open source) in 15 fields for each animal captured at 630 \times magnification (NIS-Element software).

Statistical Analysis

Data from the 3 groups were compared with the Kruskal–Wallis test, and the groups were compared 2 by 2 with the Mann–Whitney test in case of a significant Kruskal–Wallis test. The results are presented as median (interquartile range [IQR]). Statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad, San Diego, Calif). See [Appendix 1](#) and [Figure E1](#) and [Figure E2](#) for more details.

RESULTS

Preliminary Study

The aim of the preliminary study was to evaluate the feasibility and safety of right intracoronary administration of EPCs in piglets. We observed neither ischemic areas, perivascular inflammatory infiltrates, nor scarring in the tissue (data not shown). A sham piglet was sacrificed at 4 hours and a CTEPH piglet was sacrificed at 24 hours after receiving EPCs through the right coronary artery. Immunohistological analysis revealed the presence of EPCs in the RV myocardium and capillaries as well as in the right upper lobe (RUL; [Figure 2](#)). EPCs were also found in the spleen, albeit at a lower level (data not shown).

Assessment at T6

There was no difference in terms of body weight, body surface area, and hemodynamic data (mPAP, total pulmonary resistance [TPR], cardiac output, RVFAC, TAPSE, RV free wall strain, and end-systolic elastance [Ees]/arterial elastance [Ea] ratio) between the CTEPH and CTEPH+EPC groups at T0 and at T6 (data not shown).

Assessment of EPC Function

Analysis of the EPC expression markers revealed no difference between the control EPCs and the CTEPH EPCs ([Figure E3](#)). In terms of EPC function, there was no difference between the control EPCs and the CTEPH EPCs in terms of acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL) uptake ([Figure E4](#)), wound healing closure ([Figure E5](#)), and proliferation ([Figure E6, A–C](#)).

RV Function and Pulmonary Hemodynamics

Intracoronary administration of EPCs in the CTEPH animals was determined to be safe and feasible (eg, no arrhythmia, myocardial infarction, or sudden death after the procedure). Pulmonary hemodynamic as well as RV function were stable during the experiment, and the cardiac troponin I blood level returned to within the normal range 4 weeks (T10) after EPC infusion ([Figure E7](#)).

At T10, the RVFAC was not significantly different between the sham (43.5%; IQR, 33.75–45.48) and the CTEPH (32.7%; IQR, 29.5–36.5) and the CTEPH+EPC groups (39%; IQR, 37.25–46.5; sham vs CTEPH, $P = .125$ and sham vs CTEPH+EPC, $P = .889$). However, the RVFAC was significantly higher in the CTEPH+EPC group compared with the CTEPH group ($P = .030$;

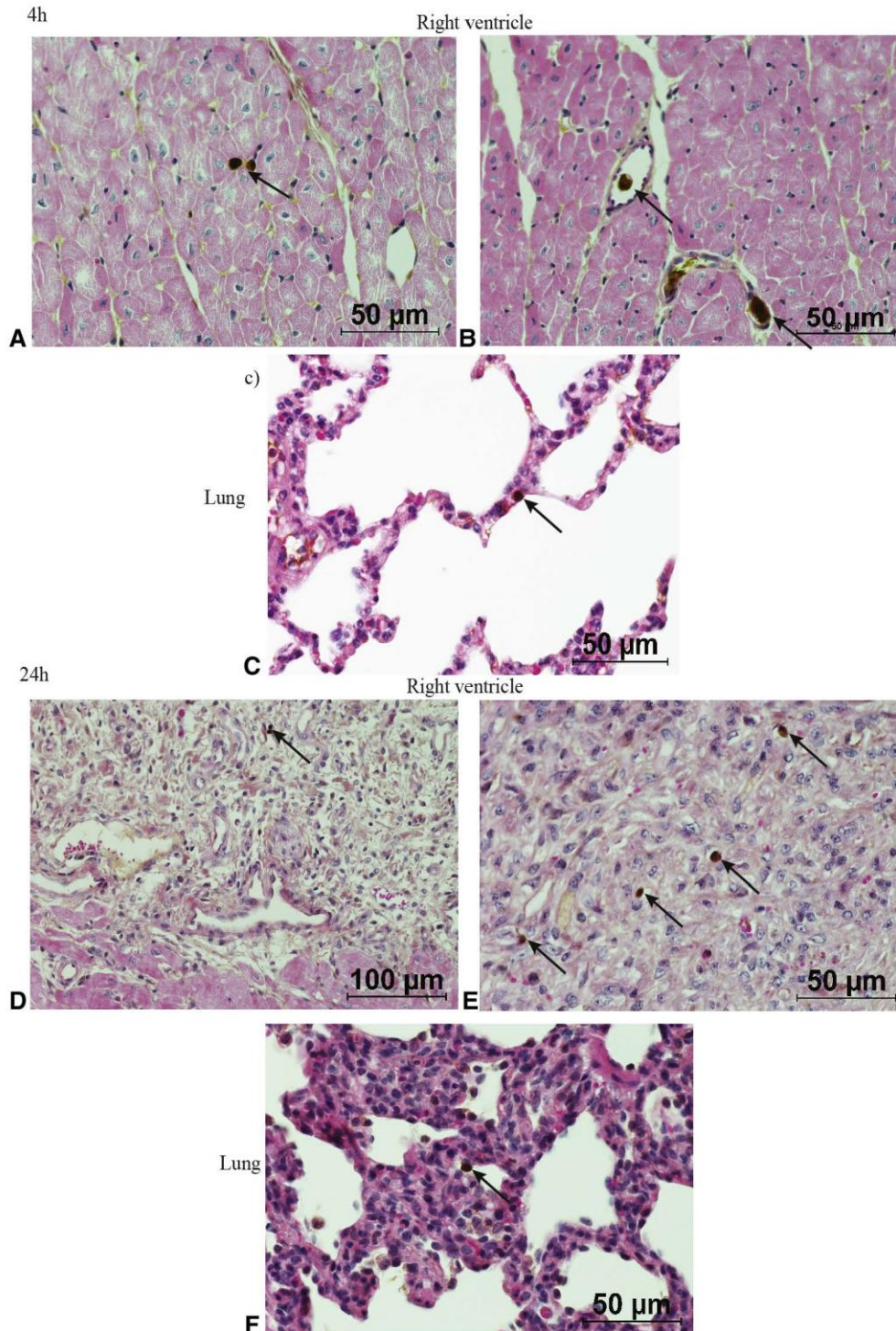


FIGURE 2. Proof of concept of endothelial progenitor cell (EPC) intracoronary administration. The location of the EPC/GFP-labeled cells was determined 4 hours after their administration in a sham pig (A, B, and C) and 24 hours after their administration in a chronic thromboembolic pulmonary hypertension pig (D, E, and F). Anti-GFP staining on HES sections revealed the presence of EPCs in right ventricle myocardium and capillaries (A and B) and in the right upper lobe (C), 4 hours after administration EPCs were found in the epicardium of the right ventricle (D and E) and in the right upper lobe (F) 24 hours after administration. *Arrows* indicate the presence of EPC. *GFP*, Green fluorescent protein.

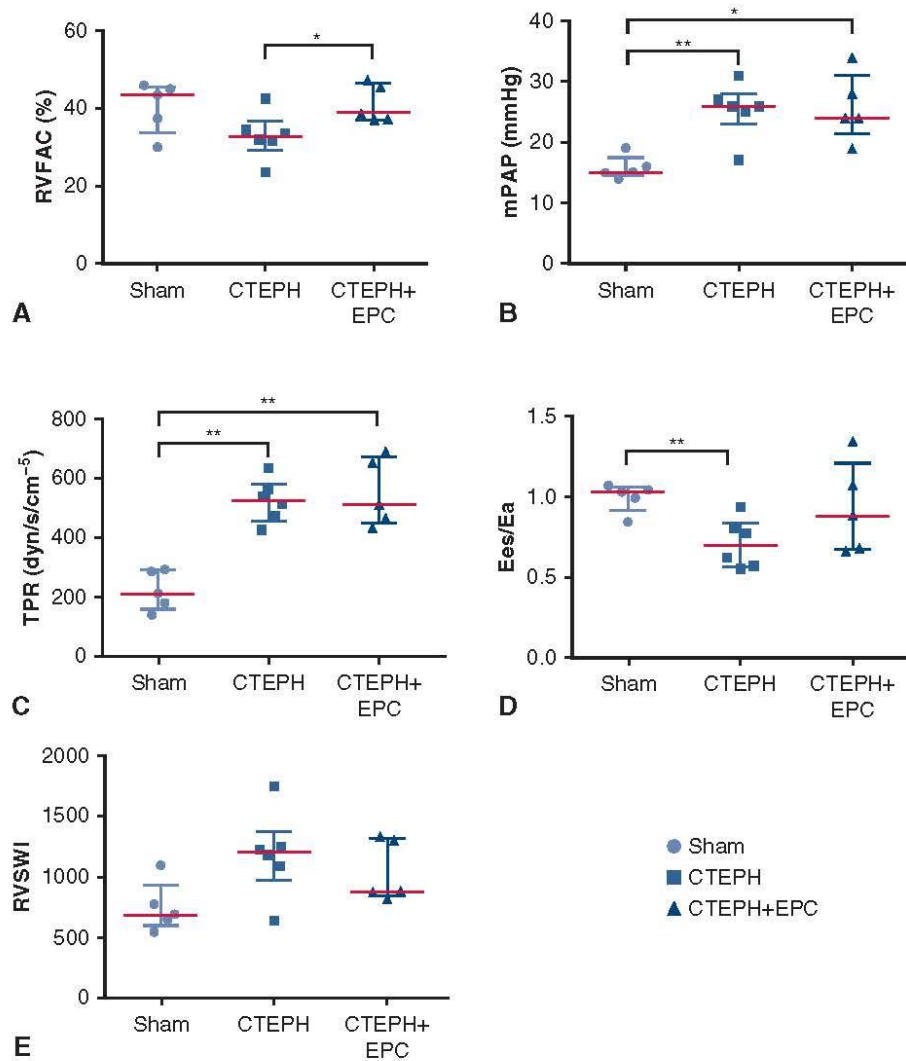


FIGURE 3. Right ventricle and lung function at T10. A, The assessment of the right ventricular fractional area change revealed an increase in RV contractility in the chronic thromboembolic pulmonary hypertension and endothelial progenitor cell infusion (CTEPH+EPC) group compared with the chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) group. Lung function was assessed by recording mean pulmonary arterial pressure (mPAP) (B) and total pulmonary resistance (TPR) (C), and it revealed an increase in these parameters in the CTEPH group and CTEPH+EPC group compared with the sham group. Right ventricle function assessed using pressure-volume loop revealed reduced ventriculoarterial coupling in the CTEPH group compared with the sham group (D). The right ventricular stroke work indexed (RVSWI) did not differ between the groups (E). * $P < .05$, ** $P < .01$. RVFAC, Right ventricular fractional area change; Ees/Ea, right ventricular to pulmonary artery coupling.

Figure 3, A). TAPSE and RV free wall strain were higher in the sham group compared with the CTEPH group and the CTEPH+EPC group (TAPSE: 21 mm; IQR, 19.5-21; 15.5 mm; IQR, 13.75-17.25, and 16 mm; IQR, 15.5-17), respectively; sham versus CTEPH, $P = .009$ and sham versus CTEPH+EPC, $P = .007$; RV free wall strain: 33% (IQR, 28.6-36), 19.5% (IQR, 15.5-27.25), and 24% (IQR, 23.5-29), respectively; sham versus CTEPH, $P = .017$ and sham versus CTEPH+EPC, $P = .031$. However, the TAPSE and RV free wall strain were not statistically different between the CTEPH group and the CTEPH+EPC group ($P = .58$ and $P = .11$, respectively; Figure E8, A and B). With regard to pulmonary

hemodynamics, the mPAP and the TPR indexed to the body surface area remained significantly lower in the sham group compared with the CTEPH group and the CTEPH+EPC group (mPAP: 15 mm Hg, IQR, 14.5-17.5; 26 mm Hg, IQR, 23-28; and 24 mm Hg, IQR, 21.5-31, respectively; sham vs CTEPH, $P = .008$ and sham vs CTEPH+EPC, $P = .016$; TPR: 211.6 dynes/s/cm⁻⁵ [IQR, 161.1-289.5], 525.8 dynes/s/cm⁻⁵ [IQR, 458.1-581.4], and 510.9 dynes/s/cm⁻⁵ [IQR, 451.7-672.1], respectively; sham vs. CTEPH, $P = .004$ and sham vs CTEPH+EPC, $P = .007$). These hemodynamic parameters did not differ significantly between the CTEPH group and CTEPH+EPC group (for mPAP: $P = .90$ and for TPR:

TABLE 1. Hemodynamic and echocardiographic measurements of the sham, CTEPH, and CTEPH+EPC groups at 10 weeks

	Sham group (n = 5)	CTEPH group (n = 6)	CTEPH+EPC group (n = 5)
Body weight (kg)	39.3 (37.8-43.65)	34.4 (32.25-34.85)	28 (26.20-34.60)
Body surface area	1.11 (1.08-1.20)	1 (0.97-1.01)	0.89 (0.85-1.01)
Right heart catheterization			
mPAP, mm Hg	15 (14.5-17.5)	26 (23-28)	24 (21.5-31)
TPR, dyn/s/cm ⁻⁵	211.6 (161.1-289.5)	525.8 (458.1-581.4)	510.9 (451.7-672.1)
Cardiac output indexed	5.53 (4.97-5.75)	3.98 (3.65-4.43)	4.12 (3.83-4.94)
Echocardiography			
RVFAC, %	43.5 (33.75-45.48)	32.7 (29.5-36.5)	39 (37.25-46.5)
TAPSE, mm	21 (19.5-21)	15.5 (13.75-17.25)	16 (15.5-17)
RV free wall strain, %	33 (28.6-36)	19.5 (15.5-27.25)	24 (23.5-29)
Conductance measurements			
Ees/Ea ratio	1.03 (0.92-1.05)	0.69 (0.56-0.83)	0.88 (0.67-1.20)

Data are presented as median (IQR). CTEPH, Chronic thromboembolic pulmonary hypertension; CTEPH+EPC, chronic thromboembolic pulmonary hypertension and endothelial progenitor cell infusion; mPAP, mean pulmonary artery pressure; TPR, total pulmonary resistance; RVFAC, right ventricular fractional area change; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; RV, right ventricle; Ees/Ea, end-systolic elastance/arterial elastance.

$P = .77$; Figure 3, B and C). Last, the Ees/Ea ratio was significantly reduced in the CTEPH group (0.69; IQR, 0.56-0.83) compared with the sham group (1.03; IQR, 0.92-1.05; $P = .008$). The absence of a significant difference between the sham and the CTEPH+EPC group (0.88; IQR, 0.67-1.20) for the Ees/Ea ratio was indicative of a tendency for improved ventriculoarterial coupling after EPC administration (Figure 3, D). The right ventricular stroke work indexed did not differ between the 3 groups (sham, 685 [IQR, 596.1-932.6], CTEPH, 1202 [IQR, 967.8-1370], and CTEPH+EPC, 868.2 [IQR, 841.2-1316]; Figure 3, E). Hemodynamic and echocardiography data are summarized in Table 1.

RV and Lung Morphometry

The PA media thickness in the RUL was greater in the CTEPH group (59.9%; IQR, 53.3-64.6) and the CTEPH+EPC group (62.4%; IQR, 54-71.3) compared with the sham group (25.3%; IQR, 22-27.6; and CTEPH vs sham, $P < .0001$; CTEPH+EPC vs sham, $P < .0001$), whereas there was no significant difference between the CTEPH animals and the CTEPH+EPC animals ($P = .44$; Figure 4, A-D). The cardiomyocyte surface area was higher in the CTEPH group (298.3 μm^2 ; IQR, 277.4-335.3) compared with the sham group (212.5 μm^2 ; IQR, 196.8-260.1; $P = .008$). Interestingly, the cardiomyocyte surface area was lower in the CTEPH+EPC group (234.6 μm^2 ; IQR, 211.1-264.7) compared with the CTEPH group (298.3 μm^2 ; IQR, 277.4-335.3; $P = .017$). There was no difference between the sham group and the CTEPH+EPC group ($P = .66$; Figure 4, F, H, I, and J). Cardiomyocyte hypertrophy was also evaluated according to the α/β myosin heavy chain (MHC) ratio. This ratio was significantly lower in the CTEPH group (0.71; IQR, 0.49-1.06) compared with the sham group (2.6; IQR, 1.87-5.25; $P = .004$). However, the α/β MHC ratio was not different after EPC

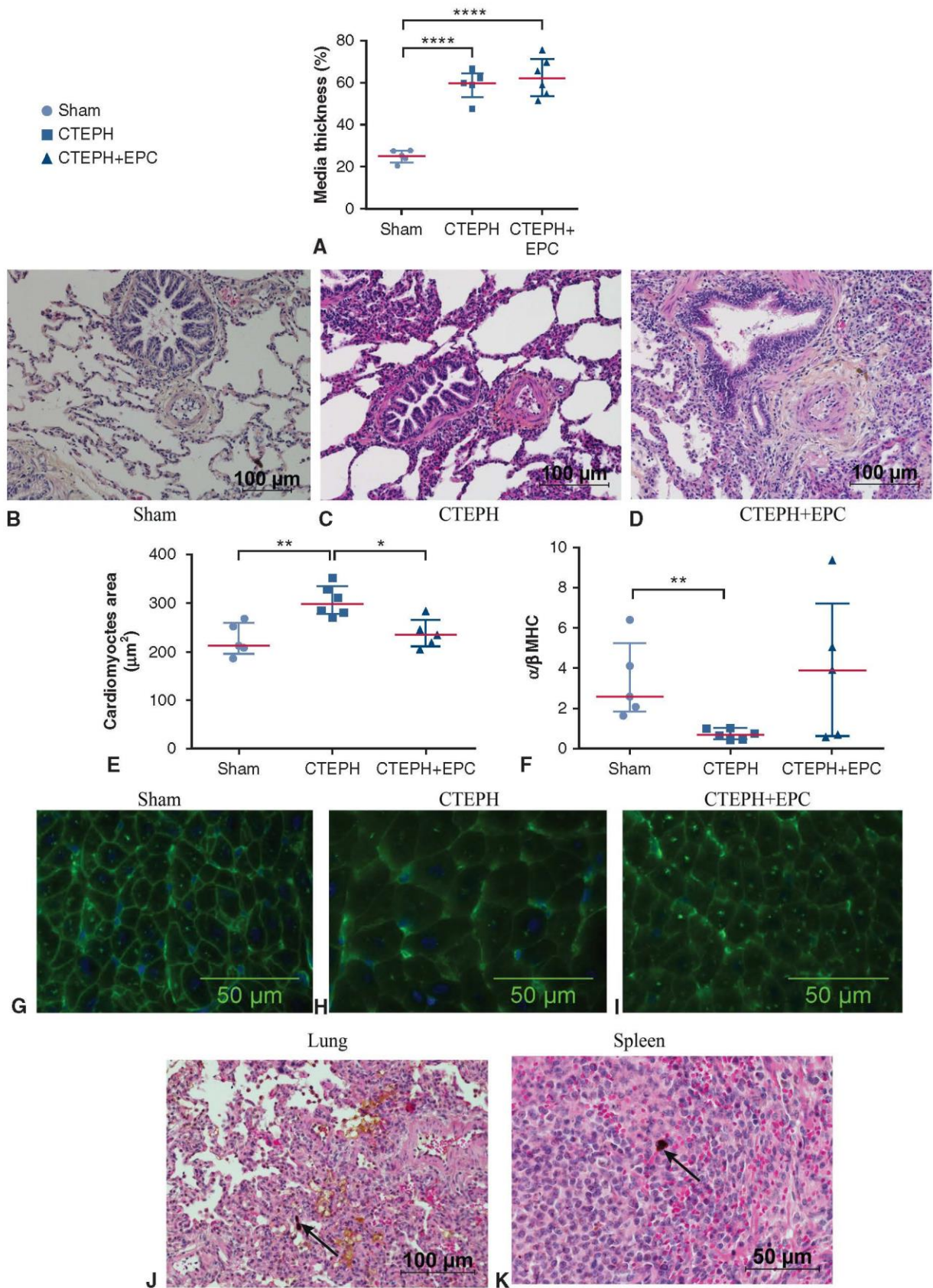
administration (CTEPH+EPC, 3.90; IQR, 0.58-7.21; and CTEPH vs CTEPH+EPC, $P = .18$; Figure 4, F). No EPCs could be detected in the right ventricle at T10, whether using histological assessment (data not shown), analysis of GFP expression using Western blot analysis (Figure E9), or real-time quantitative polymerase chain reaction. However, some EPCs were found in the RUL (Figure 4, K) and in the spleen (Figure 4, L).

RV Capillary Density

CD31 immunohistochemical analysis revealed a higher capillary density (capillary per millimeter squared) in the CTEPH group (183.5; IQR, 150.1-215.7) and CTEPH+EPC group (210.6; IQR, 190.8-228.4) compared with the sham group (133.9 [IQR, 125.2-137.9]; CTEPH vs sham, $P < .0001$ and CTEPH+EPC vs sham, $P < .0001$). There was a trend toward a higher capillary density in the CTEPH+EPC group compared with the CTEPH group ($P = .06$). CD31 protein quantification revealed increased CD31 expression (CD31/GAPDH expression) in the CTEPH+EPC group (7.14; IQR, 5.56-8.41) compared with the sham group (1.256; IQR, 0.81-1.88; $P = .008$) and the CTEPH group (3.12; IQR, 1.27-5.08; $P = .017$; Figure 5, A-E). The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A protein was markedly increased (VEGF-A/GAPDH expression) in the CTEPH group (0.22; IQR, 0.21-0.27) and the CTEPH+EPC group (0.29; IQR, 0.24-0.33) compared with the sham group (0.14 [IQR, 0.18-0.17]; CTEPH vs sham, $P = .004$; CTEPH+EPC vs sham, $P = .008$; Figure 5, F).

DISCUSSION

Autologous intracoronary injection of EPCs was associated with an improvement in RV systolic function in an animal model of CTEPH. A reduced cardiomyocyte surface area and a tendency for increased capillary density after



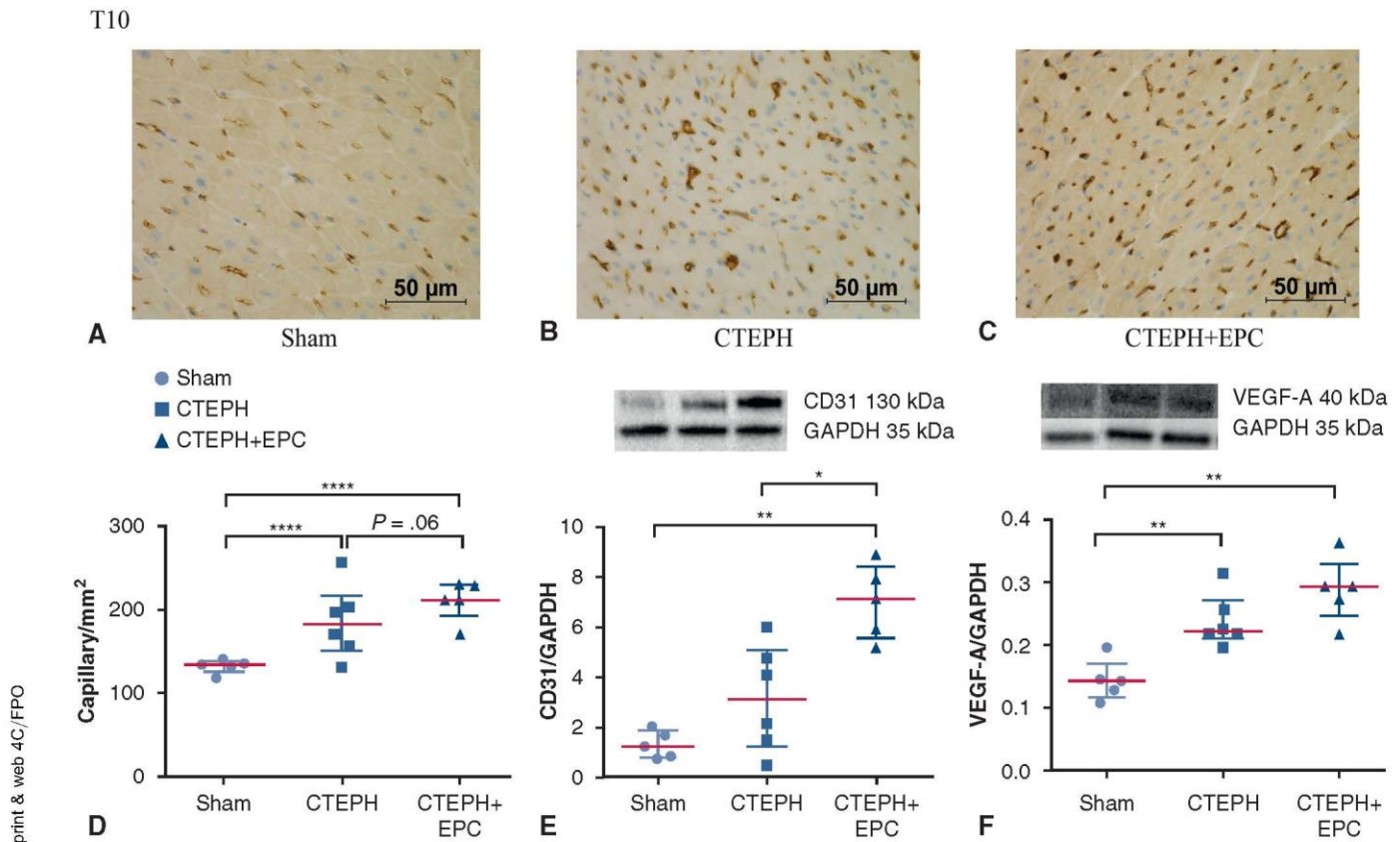


FIGURE 5. Capillary density in the right ventricle at T10. The capillary density quantification was calculated on the basis of immunostaining by CD31 antibody (A, B, and C). The capillary density was significantly higher in the chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) group and the chronic thromboembolic pulmonary hypertension and endothelial progenitor cell infusion (CTEPH+EPC) group compared with the sham group. Immunostaining by CD31 antibody revealed a tendency for increased capillary density in the CTEPH+EPC group compared with the CTEPH group (D), and this was confirmed in CD31 protein quantification (E). VEGF-A protein quantification revealed its increased expression in the CTEPH group and the CTEPH+EPC group compared with the sham group (F). * $P < .05$, ** $P < .01$, **** $P < .0001$. VEGF-A, Vascular endothelial growth factor A; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

EPC administration were also observed. EPCs were present in the RV and RUL at 4 and 24 hours after their injection in a sham and a CTEPH piglet, respectively. However, at 4 weeks they were only discernible in the RUL and spleen. No differences were observed between the CTEPH and the CTEPH+EPC piglets in terms of mPAP and TPR, as well as PA remodeling. Although the mechanistic evidence is limited, our results suggest that EPCs might exert their effect mainly on the right ventricle. Indeed, our results are consistent with a primary effect of EPCs on the right ventricle on the basis of improvement of the RVFAC and

the prevention of hypertrophy in the CTEPH+EPC group. We hypothesize that when EPCs are injected intracoronarily they pass through the right ventricle for at least the first 24 hours, during which they might secrete paracrine factors leading to a decrease in the cardiomyocyte surface area and a minor increase in capillary density that results in an improvement of the RV hemodynamic function. It should be noted that these are hypotheses; further studies are required to test these assumptions.

Intracoronary administration of stem cells has been shown to be safe and feasible.²⁰ Promising results have

FIGURE 4. Morphometric analysis of the lung and the right ventricle (RV). Measurement of the artery median thickness in the right upper lobe revealed an increase for the chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) group and the chronic thromboembolic pulmonary hypertension and endothelial progenitor cell infusion (CTEPH+EPC) group compared with the sham group, whereas endothelial progenitor cell (EPC) injection did not lead to any change in the median artery thickness (A, B, C, and D). The cardiomyocyte study revealed a reduced cardiomyocyte surface area (E), confirmed by an increase in the α/β myosin heavy chain ratio (F) in the CTEPH+EPC group compared with the CTEPH group. Wheat germ agglutinin cardiomyocyte surface staining in sham (G), CTEPH (H), and CTEPH+EPC (I) animals. GFP-labeled EPCs were not detectable in the RV 4 weeks after their injection, although some were found in the right upper lobe (J) and the spleen (K). Arrows in these panels show the presence of EPC. * $P < .05$, ** $P < .01$, **** $P < .0001$. GFP, Green fluorescent protein.

been obtained in terms of improvement of left ventricular function in patients with heart failure such as myocardial infarction²¹ and dilated cardiomyopathy,²² although in some cases the true effectiveness of the cell therapy is debatable. Using a porcine model of CTEPH, we showed that intracoronary administration of EPCs is safe and feasible (eg, no arrhythmia, myocardial infarction, or sudden death after the procedure). In keeping with previous studies that used an intracoronary delivery route,²³ there was low cell retention at 4 weeks. The observed absence of EPCs was not because of a lack of GFP expression over time because GFP was transmitted to the daughter cells after cell division. Low cell retention is one of the major drawbacks of intracoronary administration as a result, in this case, it might not be the optimal route of administration.

To our knowledge we are the first to administer EPCs directly into the right ventricle of a PH model.²⁴ To date, most of the other EPC therapy studies targeting PH cannot readily be compared with ours because they used the monocrotaline-induced PH rat model. With this model, there is targeting of the pulmonary circulation rather than RV function using intravenous EPC administration. The effects on the right ventricle were indirect, because pronounced pulmonary effects such as reduced pulmonary arteriole muscularization, reduced pulmonary vessel wall thickening, and an increased number of lung small arterioles were also observed.^{25,26} In contrast, in our study, intracoronary EPC administration improved RV function independently of a decrease in the RV afterload.

After intracoronary administration of EPCs, a decrease in the cardiomyocyte area was observed. Gu and colleagues showed that EPC-derived microvesicles were able to prevent angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro.²⁷ The reduced cardiomyocyte area and the tendency to a decreased α/β MHC ratio observed after EPC injection suggests that these cells reversed the RV remodeling. RV reverse remodeling has already been reported in PH patients after lung transplantation,²⁸ pulmonary endarterectomy,²⁹ and balloon pulmonary angioplasty.³⁰ In this study, RV hypertrophy seemed to be prevented by stem cell therapy. Ventricular hypertrophy could be deleterious in case of myocardial ischemia. Indeed, ventricular hypertrophy, combined with increased afterload and increased wall stress, has been shown to lead to increased myocardial oxygen demand and, as a result, myocardial ischemia.³¹ In this study, the stem cell therapy used might have reversed cardiac remodeling of the right ventricle.

EPCs can participate directly in revascularization by repairing damaged vessels or by forming neovessels. Their role in the induction of angiogenesis through direct integration into vessels has been shown using murine models of ischemia.¹⁰⁻¹² EPCs administered into myocardial infarcted rats have been shown to secrete paracrine factors

that lead to a favorable cardiac remodeling.^{9,32} Because there is poor cell retention, the effects that we observed were likely due to paracrine secretion by the EPCs. fibroblast growth factor-2, IGF-1, and stromal cell-derived factor-1 α are paracrine factors for which levels were increased in ischemic heart after EPC transplantation.⁹ Furthermore, a positive effect after EPC administration on left ventricle post myocardial infarction was found to be mediated by IGF-1.³² Surprisingly, the level of VEGF was upregulated despite a lack of an effect on capillary growth. There might be 2 explanations for this increase in the level of VEGF: (1) EPCs might give rise to a self-sustaining angiogenic microenvironment at the time of RV injection; and (2) the capillary density might not have reached a sufficient level to cover RV needs despite the increase in VEGF expression. Although we have few mechanistic data, we speculate that the observed effect could be a result of one of these paracrine factors.

Although RV function determines PH patient survival,¹ when the afterload of the right ventricle is alleviated by pulmonary endarterectomy or lung transplantation, the right ventricle has the ability to remodel and return to normal within weeks or months.^{28,33} Only targeting the right ventricle would hence provide little benefit, because the pulmonary vasculature would still be obstructed and the right ventricle would therefore still be subject to a high afterload. Because the stem cell therapy that we developed only targets the right ventricle, we aim to use this therapy in combination with current therapies targeting the pulmonary vasculature. The additional targeting of the right ventricle with our EPC-based therapy might prolong the survival of patients.

Limitations

One major limitations of our experimental CTEPH model is the lack of a decrease in the capillary density in the right ventricle. We sacrificed the animals at 4 weeks after the establishment of PH, as opposed to Noly and colleagues,¹⁷ who studied the same model after 14 weeks, at which time they found a decrease in the capillary density. To overcome the absence of reduced capillary density, a different model could be investigated so as to evaluate the effect of EPCs in the right ventricle without having the pulmonary component. Alternatively, the time of EPC administration could be delayed to obtain a higher level of RV dysfunction, thus leading to the capillary rarefaction, as observed by Noly and colleagues.¹⁷ Finally, heterogeneity of the disease between piglets at T6 makes it difficult to observe significant effects of therapy. However, because the model is stable over the time,¹⁷ we are confident that the disease phenotype is not temporary.

Although we showed differences between groups considering RVFAC evaluation, we only found a significant difference between CTEPH with and without EPCs. The lack of

power of the study, the low severity of the modeled disease, and the early post injection evaluation might explain these results. However, despite this animal model-induced limitations, we found that RV function was significantly improved after EPC injection in CTEPH animals.

In this study, peripheral blood collection was only performed in the CTEPH+EPC pigs. Because blood collected was less than 7.5% of the piglets' blood volume the recovery period lasted <1 week.³⁴ We assume that it did not affect our comparative results.

Despite EPC availability in peripheral blood of PH patients,³⁵ the main concerns regarding the translation of this cell therapy to clinical studies is the use of autologous cells. First, it could be particularly taxing for severe PH patients to provide a significant blood sample to isolate EPCs. Second, the timing between blood sampling, EPC isolation and proliferation, and EPC administration needs to be fully optimized. One solution could be to collect blood after diagnosis of the disease, then to isolate and freeze the EPCs and wait for the patient to be ready for their administration. Third, EPCs isolated from patients with PH might have altered functionality³⁶ and would require an assessment before use. EPCs isolated from cord blood could be an alternative to autologous EPCs for overcoming all of these limitations. Several studies have shown the superiority of cord blood EPCs over adult EPCs in terms of their proliferative capacity and their ability to create new vessels and to participate in angiogenesis, and their use has already been proposed for several clinical applications.³⁷⁻³⁹

CONCLUSIONS

Using a porcine model of CTEPH, right intracoronary EPC administration seemed to have a positive effect on RV adaptation to PH. Further studies are needed to determine the best way for administering EPCs, and to confirm these encouraging results in other types of PH models. EPC therapy appears to be a promising therapy to sustain RV function in PH. When used in combination with pulmonary circulation-targeted therapies, this new therapy has the potential to provide clinical benefits for PH patients.

Conflict of Interest Statement

Authors have nothing to disclose with regard to commercial support.

References

- Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, et al. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:183-8.
- Ryan JJ, Archer SL. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension: part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2015;131:1691-702.
- Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014;115:176-88.
- Sutendra G, Dromparis P, Paulin R, Zervopoulos S, Haromy A, Nagendran J, et al. A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *J Mol Med Berl Ger*. 2013;91:1315-27.
- Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation*. 2009;120:1951-60.
- Ruiter G, Ying Wong Y, de Man FS, Louis Handoko M, Jaspers RT, Postmus PE, et al. Right ventricular oxygen supply parameters are decreased in human and experimental pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32:231-40.
- Gómez A, Bialostozky D, Zajarias A, Santos E, Palomar A, Martínez ML, et al. Right ventricular ischemia in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1137-42.
- Boyer-Di Ponio J, El-Ayoubi F, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Driancourt C, Godet M, et al. Instruction of circulating endothelial progenitors in vitro towards specialized blood-brain barrier and arterial phenotypes. *PLoS One*. 2014;9:e84179.
- Kim SW, Jin HL, Kang SM, Kim S, Yoo KJ, Jang Y, et al. Therapeutic effects of late outgrowth endothelial progenitor cells or mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood on infarct repair. *Int J Cardiol*. 2016;203:498-507.
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000;105:1527-36.
- Flex A, Biscetti F, Iachininoto MG, Nuzzolo ER, Orlando N, Capodimonti S, et al. Human cord blood endothelial progenitors promote post-ischemic angiogenesis in immunocompetent mouse model. *Thromb Res*. 2016;141:106-11.
- Peng XG, Bai Y, James JR, Shlapak DP, Ju S. Transplanted endothelial progenitor cells improve ischemia muscle regeneration in mice by diffusion tensor MR imaging. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3641401.
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
- Mercier O, Tivane A, Dorfmueller P, de Perrot M, Raoux F, Decante B, et al. Piglet model of chronic pulmonary hypertension. *Pulm Circ*. 2013;3:908-15.
- Noly PE, Guihaire J, Coblenz M, Dorfmueller P, Fadel E, Mercier O. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension and assessment of right ventricular function in the piglet. *J Vis Exp*. 2015:e53133.
- Guihaire J, Haddad F, Boulate D, Capderou A, Decante B, Flécher E, et al. Right ventricular plasticity in a porcine model of chronic pressure overload. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33:194-202.
- Noly PE, Haddad F, Ataam JA, Langer N, Dorfmueller P, Loisel F, et al. The importance of capillary density/stroke work mismatch for right ventricular adaptation to chronic pressure overload. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;154:2070-9.
- Vonk Noordegraaf A, Haddad F, Bogaard HJ, Hassoun PM. Noninvasive imaging in the assessment of the cardiopulmonary vascular unit. *Circulation*. 2015;131:899-913.
- Bensley JG, De Matteo R, Harding R, Black MJ. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Sci Rep*. 2016;6:23756.
- Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Socan A, Domanovic D, et al. Comparison of transendocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128(11 Suppl 1):S42-9.
- Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmoro JB, Kajstura J, et al. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126(11 Suppl 1):S54-64.
- Lezaic L, Socan A, Poglajen G, Peitl PK, Sever M, Cukjati M, et al. Intracoronary transplantation of CD34(+) cells is associated with improved myocardial perfusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2015;21:145-52.
- Li X, Tamama K, Xie X, Guan J. Improving cell engraftment in cardiac stem cell therapy. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7168797.
- Loisel F, Provost B, Haddad F, Guihaire J, Amsallem M, Vrtovec B, et al. Stem cell therapy targeting the right ventricle in pulmonary arterial hypertension: is it a potential avenue of therapy? *Pulm Circ*. 2018;8. 2045893218755979.

25. Yip HK, Chang LT, Sun CK, Sheu JJ, Chiang CH, Youssef AA, et al. Autologous transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Crit Care Med*. 2008;36:873-80.
26. 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.
27. Gu S, Zhang W, Chen J, Ma R, Xiao X, Ma X, et al. EPC-derived microvesicles protect cardiomyocytes from Ang II-induced hypertrophy and apoptosis. *PLoS One*. 2014;9:e85396.
28. Sarashina T, Nakamura K, Akagi S, Oto T, Oe H, Ejiri K, et al. Reverse right ventricular remodeling after lung transplantation in patients with pulmonary arterial hypertension under combination therapy of targeted medical drugs. *Circ J*. 2017; 81:383-90.
29. Berman M, Gopalan D, Sharples L, Sreaton N, Maccan C, Sheares K, et al. Right ventricular reverse remodeling after pulmonary endarterectomy: magnetic resonance imaging and clinical and right heart catheterization assessment. *Pulm Circ*. 2014;4:36-44.
30. Fukui S, Ogo T, Morita Y, Tsuji A, Tateishi E, Ozaki K, et al. Right ventricular reverse remodelling after balloon pulmonary angioplasty. *Eur Respir J*. 2014;43: 1394-402.
31. Stanton T, Dunn FG. Hypertension, left ventricular hypertrophy, and myocardial ischemia. *Med Clin North Am*. 2017;101:29-41.
32. Hynes B, Kumar AH, O'Sullivan J, Klein Buneker C, Leblond AL, Weiss S, et al. Potent endothelial progenitor cell-conditioned media-related anti-apoptotic, cardioprotective, and pro-angiogenic effects post-myocardial infarction are mediated by insulin-like growth factor-1. *Eur Heart J*. 2013;34:782-9.
33. Reesink HJ, Marcus JT, Tulevski II, Jamieson S, Kloek JJ, Vonk Noordegraaf A, et al. Reverse right ventricular remodeling after pulmonary endarterectomy in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: utility of magnetic resonance imaging to demonstrate restoration of the right ventricle. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133:58-64.
34. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 2001;21:15-23.
35. Smadja DM, Mauge L, Sanchez O, Silvestre JS, Guerin C, Godier A, et al. Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2010;36:1284-93.
36. Grisar JC, Haddad F, Gomari FA, Wu JC. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent. *Biomark Med*. 2011;5:731-44.
37. Au P, Daheron LM, Duda DG, Cohen KS, Tyrrell JA, Lanning RM, et al. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood*. 2008;111:1302-5.
38. Janic B, Arbab AS. Cord blood endothelial progenitor cells as therapeutic and imaging probes. *Imaging Med*. 2012;4:477-90.
39. Kim J, Jeon YJ, Kim HB, Shin JM, Chung HM, Chae JI. Comparative proteomic analysis of endothelial cells progenitor cells derived from cord blood and peripheral blood for cell therapy. *Biomaterials*. 2013;34:1669-85.

Key Words: pulmonary hypertension, right ventricle, stem cell therapy, endothelial progenitor cells

APPENDIX 1. SUPPLEMENTAL METHODS

Chronic Thromboembolic Piglet Model

Three of the CTEPH piglets died as a result of an acute right heart failure after embolization. Another animal was withdrawn from the study because of bacterial contamination of the cultured EPCs. Because this event occurred after 2 weeks of cell culture, the animal was withdrawn from the study. There were no deaths related to infection of the surgical site. A sham animal died 2 weeks after being included in the study, independently of the experimental procedures. There were no deaths in the CTEPH+EPC group after EPC administration (T6), nor were there any in the CTEPH group after saline administration (T6). Cardiac troponin I levels were measured just before EPC administration and at 1, 4, and 24 hours, and 4 weeks later using Dimension Vista (Siemens, Newark, NJ).

All of the animals received humane husbandry and care, and they were housed at the Marie Lannelongue animal facilities under conditions that complied with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication 86-23, revised in 1996) and the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes (APAFIS 7649-2016-112114519868v1).

EPC Harvesting

Peripheral blood samples of 100 mL were only collected from the CTEPH+EPC piglets at 3 weeks to isolate EPCs. An autologous cell-based therapy was established because the treated piglets received EPCs isolated 3 weeks previously from their own blood. EPCs were harvested using isolation of peripheral blood mononuclear cells using gradient centrifugation in Pancoll (Dutsher, Burmath, France), after which they were plated at a density of 50,000 cells/cm².^{E1} The peripheral blood mononuclear cells were maintained in endothelial basal medium-2 supplemented with EGM2-MV Single-Quots (containing human endothelial growth factor, hydrocortisone, gentamicin, fetal bovine serum, VEGF, human fibroblast growth factor-B, R³-IGF-1, and ascorbic acid; Lonza, Emmerainville, France) at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. After 8 to 15 days, cell colonies became visible and they were detached using trypsinization, followed by seeding at 10,000 cells/cm² for expansion. The EPCs were characterized by fluorescence-activated cell sorting analysis (Figure E1, A). The cells were detached using trypsinization and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% bovine serum albumin. Separate stainings were performed for 30 minutes with each of the following antibodies: anti-CD31 (PECAM-1 at 1:100 dilution; Millipore, Burlington, Mass), anti-CD144 (Ve-Cadherin at 1:10 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex), and anti-VEGF receptor-2 at 1:20 dilution; Millipore). To detect these markers, the cells were stained with fluorescent secondary antibodies: goat anti-mouse Alexa Fluor 488 or donkey anti-goat Alexa Fluor 546 (Invitrogen). Fluorescence-activated cell sorting analysis was performed with a BD Accuri C6 Plus platform (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) and the flow data were analyzed with BD Accuri C6 software (BD Bioscience). All of the administered EPCs were transduced with a lentivirus expressing GFP (Vectalys; Canal Biotech II, Toulouse, France) and they were detected with an anti-GFP antibody (GFP 2555 at 1:400 dilution, Cell Signaling Technology, Danvers, Mass) visualized using ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana) staining with Benchmark GX (Roche). To ensure a pure EPC fraction, in addition to being characterized by their expression markers, the EPCs were also assessed for their ability to internalize Ac-LDL. Briefly, EPCs were incubated with 15 µg/mL of Ac-LDL AlexaFluor 488 (Invitrogen) for 4 hours at 37°C. After washes with PBS, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). The fluorescent cells were observed using a Leica DMR fluorescence microscope (Wetzlar, Germany) (Figure E1, B).

EPC Administration

EPC viability was assessed after saline resuspension, shortly before their administration (Figure E2). Briefly, a fluorescent viability staining solution (7AAD) was added to EPCs resuspended in saline solution, and the fluorescence was analyzed using flow cytometry. EPCs resuspended in culture medium and permeabilized EPCs served as controls.

Tissue Harvesting

At T10, random biopsies of the RUL were fixed with 4% PFA, processed using standard histology techniques, and morphometric measurements were performed to determine the artery media thickness using imaging software (NIS-Elements, Nikon). The PA media thickness of RUL pulmonary arteries (70-250 µm in diameter) was calculated as (external diameter – internal diameter/external diameter) × 100. All of the morphometric studies were performed in a blinded manner. The RV free wall, left ventricle, liver, kidney, and spleen biopsies were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C for molecular biology analyses; or fixed with 4% PFA solution for histology processing and morphometric measurements.

Real-Time Quantification Using Polymerase Chain Reaction

RNA was obtained using phenol-chloroform extraction and a gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Reverse transcription was performed using 1 µg of RNA with the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. During fetal development, α-MHC replaces β-MHC as the dominant transcript in the heart. In cardiac hypertrophy, there is a shift from the normally predominant α-MHC toward β-MHC.^{E2} In light of this change on hypertrophy, α-MHC and β-MHC expression were quantified with specific TaqMan probes: α-MHC (Hs01101447_g1, ThermoFisher Scientific, Mass) and β-MHC (Ss03392423_m1, ThermoFisher Scientific). Relative quantification was achieved with the comparative 2^{–ΔΔCt} method by normalization with 18S RNA as the reporter gene.

Western Blot Analysis

Protein extracts were obtained using a gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec), resolved on 4% to 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), blocked with 5% bovine serum albumin in tris-buffered saline containing 0.1% Tween and then incubated with anti-CD31 polyclonal antibody (1:250, purified rabbit anti-human; Abcam 28364; Abcam, Cambridge, United Kingdom) or anti-VEGF-A antibody (1:1,000, purified mouse anti-pig, Novus Biological, Littleton, Colo). After incubation with secondary donkey anti-rabbit antibody (1:500, Santa Cruz sc2313) or donkey anti-mouse (1:2000, Santa Cruz sc2314), immunoreactive bands were detected using chemiluminescence with a Perkin Elmer Kit (ECL Plus; Perkin Elmer, Waltham, Mass) in a Chemidoc (Bio-Rad) instrument. Relative quantification was performed by normalization with GAPDH.

Hemodynamic Assessments

To assess heart rate, mPAP, and cardiac output, an 8-French introducer (Radiofocus Introducer II; Terumo, Tokyo, Japan) was placed percutaneously in the upper vena cava according to the Seldinger technique. A 7-French Swan-Ganz catheter (Edwards Lifesciences, Irvine, Calif) was introduced into the upper vena cava, then into the right heart following the pressure curve of the right atrium and the right ventricle, and finally into the PA. Systolic, diastolic, and mPAP were measured in maximal exhalation under 100% FiO₂. The TPR was calculated using the formula: TPR (dyn/s^{–1}/cm^{–5}) = (mPAP × 80)/cardiac output. The cardiac output was obtained using the direct thermodilution method (Vigilance Monitor

VGS2V, Edwards Lifesciences) by injecting 10 mL of frozen physiological serum (temperature between 1°C and 4°C). The average of 3 consecutive measurements was recorded. The values obtained were indexed to the body surface area defined by Kelly's equation: body surface area (cm^2) = $734 \times \text{weight (kg)}^{0.656}$.

For pressure-volume loop analysis, an 8-French balloon catheter was inserted percutaneously through the right femoral vein up to the inferior vena cava-right atrium junction under fluoroscopic guidance. During the pressure-volume loop recordings, the balloon was inflated to progressively reduce the RV preload and thus modify the pressure-volume loop aspect. The slope of the end-systolic pressure-volume relationship defined the Ees of the right ventricle. The ratio of RV end-systolic pressure to stroke volume defined the pulmonary Ea, and the Ees/Ea ratio was thus obtained, corresponding to the value of the RV-PA coupling. All of the measurements were repeated 3 times and averaged.

To compare EPCs before and after CTEPH establishment we isolated EPCs from 3 piglets at 2 time points ($n = 3$, paired sample):

- First time point: blood samples were collected shortly before the ligation of the left PA, which is the first step of the CTEPH establishment in piglets (T0).
- Second time point: blood samples were collected when CTEPH was established in piglets (T6).

Ac-LDL Uptake

EPCs were cultured with 15 $\mu\text{g/mL}$ of Ac-LDL Alexa Fluor 488 for 4 hours at 37°C. Internalization of Ac-LDL was visualized using a fluorescence microscope at 200 \times magnification (NIS-Element software; Nikon).

Wound Healing Assay

For the cellular healing migration assay, 21,000 EPCs were seeded in each part of the culture insert (Ibidi 80241; Martinsried, Germany). When the cells reached confluency, the culture insert was removed, thereby creating a reproducible cell-free gap. The cells were washed with 1 \times PBS and then incubated in endothelial growth medium-2 medium. Filling of the wound area was immediately captured using videomicroscopy (Metamorph software, version 7.7; 10 \times objective; Olympus, Tokyo, Japan) over a period of 24 hours, during which the cells were incubated at 37°C and a 5% CO_2 atmosphere. The cell-free area in the center of the well was imaged every hour and its area was determined using ImageJ software. To search for a statistical difference between the control and the CTEPH EPCs, a linear regression was applied using Prism 6 software (GraphPad).

Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Cell Proliferation

EPCs were seeded at a density of 5000 cells/ cm^2 and they were incubated with 0.5 μM carboxyfluorescein succinimidyl ester (Vybrant

CFDA SE Cell Tracer Kit, ThermoFisher Scientific, Mass) for 10 minutes when they had adhered to the culture substrate. Incubation of cells with carboxyfluorescein succinimidyl ester results in covalent labeling of intracellular proteins with a stable dye, and every generation of cells appears as a distinct peak on a flow cytometry histogram. The cells were then washed with 1 \times PBS and incubated in medium, except for at time 0 hours, at which the cells were detached using trypsinization and analyzed using a flow cytometer with excitation at 488 nm and emission filters appropriate for the detection of the fluorescent signal. Cell fluorescence was also assessed at 24, 48, and 72 hours to evaluate cell proliferation over 3 days.

MTS Assay

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay is a colorimetric method for determining the number of viable cells in a population; 5000 EPCs were seeded in triplicate in a 96-well plate, and the cells were then incubated with MTS reagent (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, Wis) for 2 hours according to the manufacturer's instructions. The absorbance at 490 nm was then measured using a ThermoLabSystem Multiskan EX (ThermoFisher Scientific, Mass).

Bromodeoxyuridine Incorporation Assay

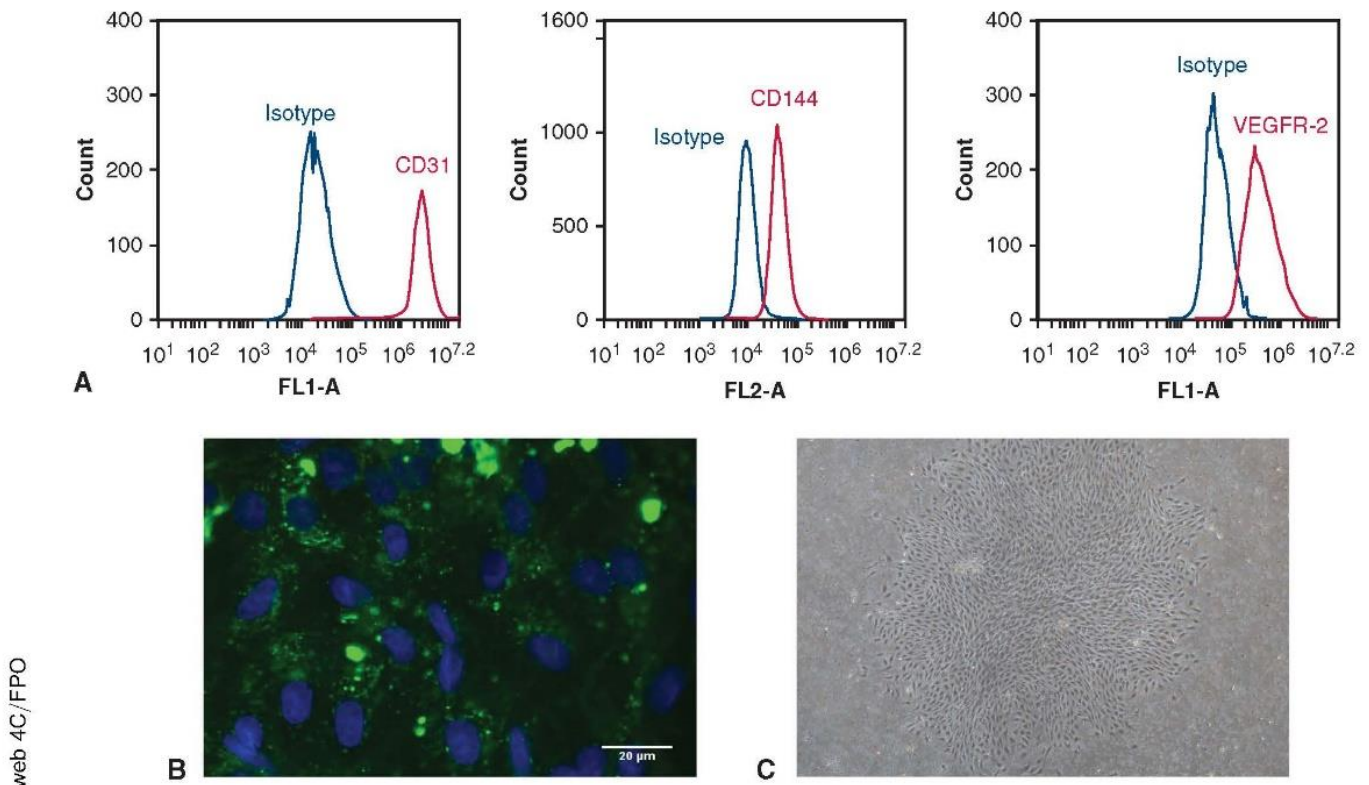
Bromodeoxyuridine (5-bromo-2-deoxyuridine; BrdU) is a synthetic analogue of the nucleoside thymidine and it is used to identify proliferating cells. EPCs were seeded in triplicate in 96-well plates (at 7500 cells per well), and the cells were then incubated with BrdU for 4 hours according to the manufacturer's instructions (BrdU Cell Proliferation Assay Kit 6813, Cell Signaling Technology). After fixation of the cells and incubation with primary and secondary antibodies followed by substrate, the absorbance was measured at 450 nm using a ThermoLabSystem Multiskan EX (ThermoFisher Scientific, Mass).

Statistical Analysis for the Supplemental Methods

The control group and the CTEPH group were compared 2 by 2 with the Wilcoxon matched-pairs rank test. The results are presented as median (IQR). P values $< .05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad).

E-References

- E1. Vanneaux V, El-Ayoubi F, Delmau C, Driancourt C, Lecourt S, Grelier A, et al. In vitro and in vivo analysis of endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application? *Cell Transplant*. 2010;19:1143-55.
- E2. Machackova J, Barta J, Dhalla NS. Myofibrillar remodeling in cardiac hypertrophy, heart failure and cardiomyopathies. *Can J Cardiol*. 2006;22:953-68.



web 4C/FPO

FIGURE E1. Endothelial progenitor cell (EPC) characterization. Analysis of EPC expression markers (CD31, CD144, and VEGFR-2) using flow cytometry (A). Uptake of acetylated low-density lipoprotein (*Ac-LDL*) by EPCs (B). Colony of EPCs 8 days after peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation (C). Magnification $\times 10$. *VEGFR*, Vascular endothelial growth factor receptor.

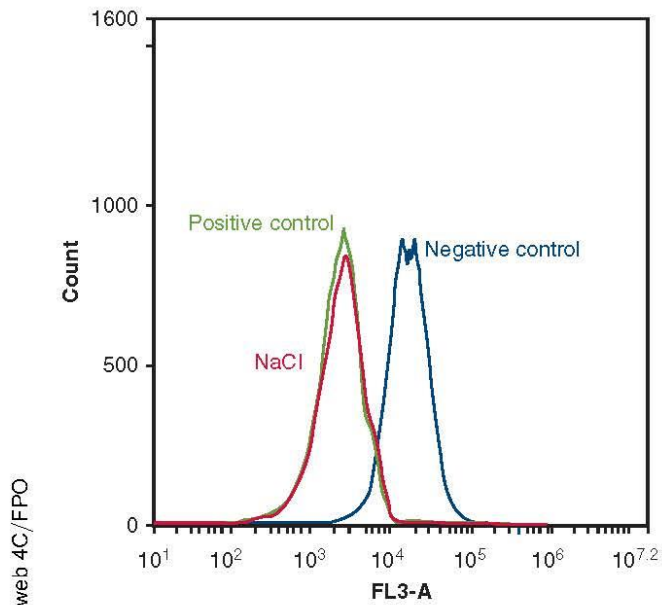


FIGURE E2. Endothelial progenitor cell (*EPC*) viability after saline resuspension. Positive control represents *EPCs* resuspended in cell culture media, negative control represents permeabilized *EPCs* (resuspended with Cytofix/Cytoperm [Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ]), and NaCl represents *EPCs* resuspended in NaCl. Ten minutes after their resuspension, a viability staining solution (7AAD) was added to the cells and its fluorescence was analyzed using flow cytometry. FL-3 corresponds to 7AAD fluorescence (Becton Dickinson); 7AAD incorporation between positive control and NaCl condition did not differ, showing no cell death after saline resuspension ($n = 3$).

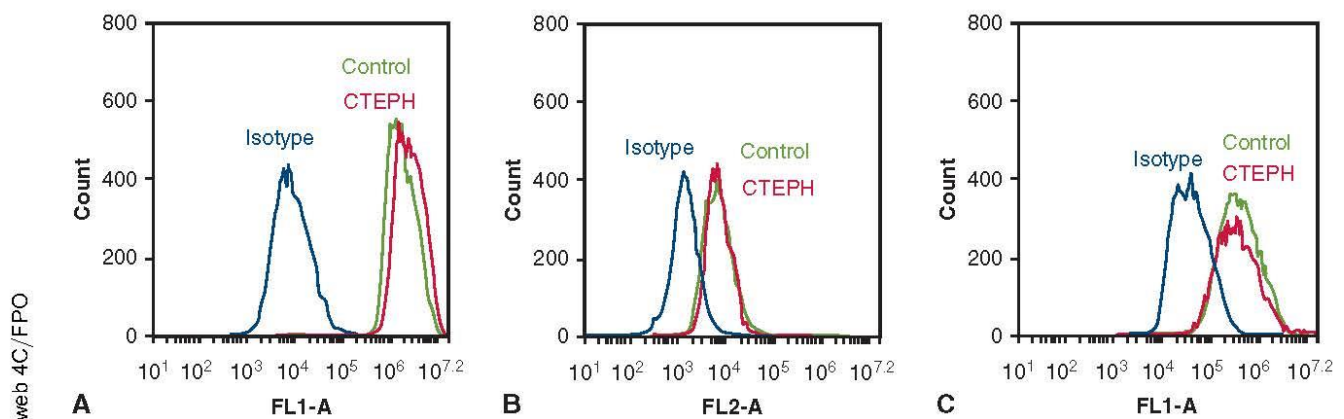


FIGURE E3. Phenotypic characterization of endothelial progenitor cells (*EPCs*) before and after the establishment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (*CTEPH*): expression of the following markers: CD31 (A), CD144 (B), and VEGFR-2 (C). *VEGFR*, vascular endothelial growth factor receptor.

web 4C/FPO

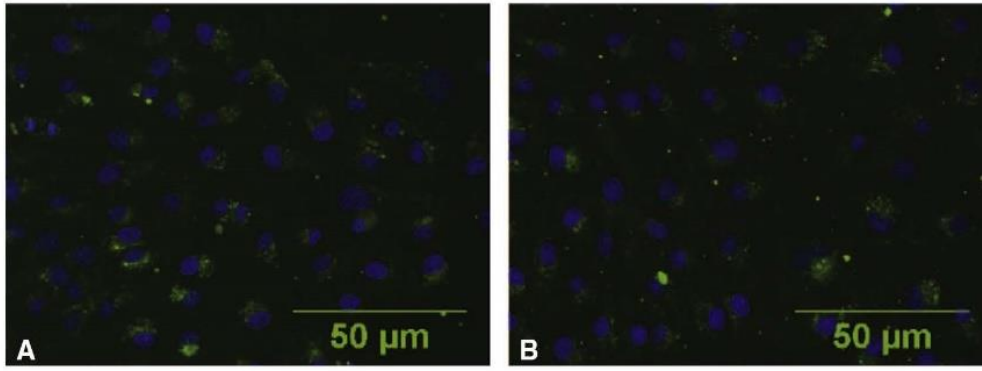
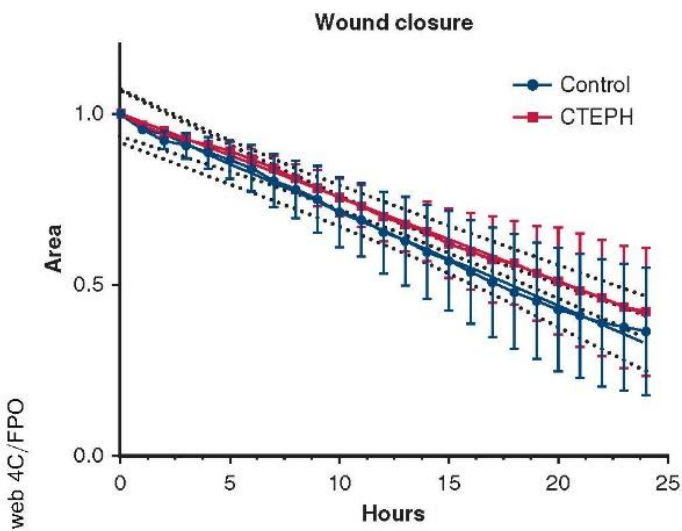


FIGURE E4. Incorporation of acetylated low-density lipoprotein by endothelial progenitor cells isolated before (A) and after (B) the establishment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.



web 4C/FPO

FIGURE E5. Wound closure by migration and proliferation of endothelial progenitor cells isolated before and after the establishment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH).

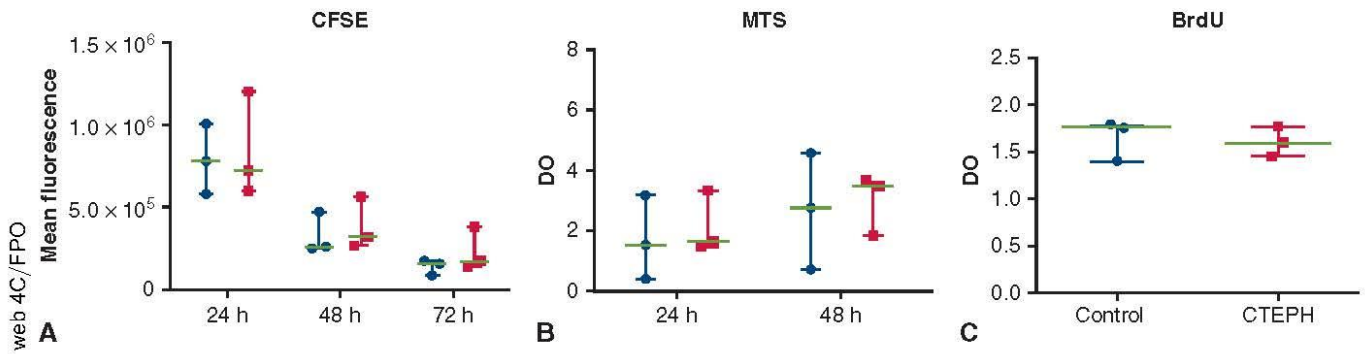


FIGURE E6. Proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs) isolated before and after the establishment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) by measuring dye dilution during their proliferation (carboxyfluorescein succinimidyl ester; Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass) (A), by analyzing their metabolic activity (MTS assay) (B), and their proliferation using a 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) test (C).

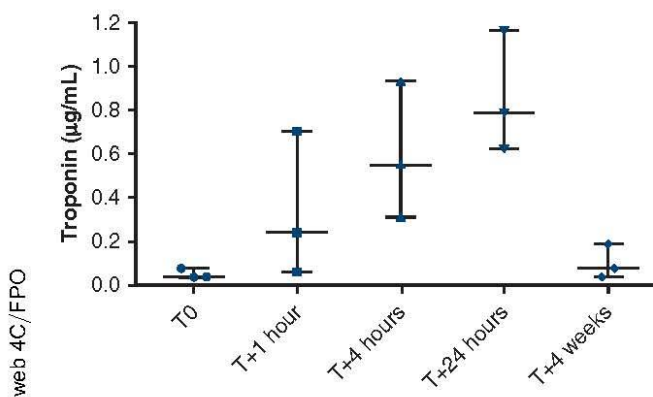


FIGURE E7. Cardiac troponin I level before and 1, 4, and 24 hours and 4 weeks after right intracoronary endothelial progenitor cell administration.

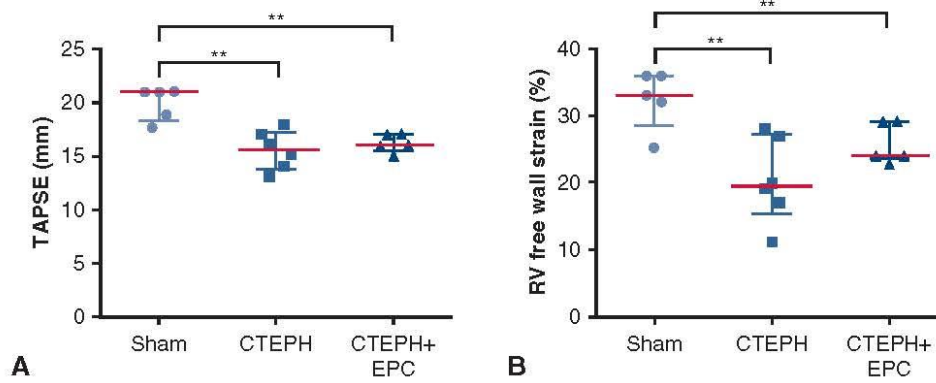


FIGURE E8. Right ventricle (RV) function. At T10, there was no difference between the chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) and chronic thromboembolic pulmonary hypertension and endothelial progenitor cell infusion (CTEPH+EPC) groups regarding echographic parameters such as tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) (A) and RV free wall strain (B). ** $P < .01$.

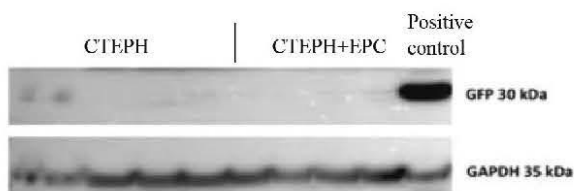


FIGURE E9. Analysis of GFP expression in right ventricle (RV) in Western blot analysis 4 weeks after right intracoronary administration of the endothelial progenitor cells (EPCs). CTEPH, chronic thromboembolic pulmonary hypertension; CTEPH+EPC, chronic thromboembolic pulmonary hypertension and endothelial progenitor cell infusion; GFP, green fluorescent protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Culture *in vitro* : cardiomyocytes et milieu conditionné d'ECFC

Contexte

Lors de notre étude d'administration d'ECFC par voie intracoronaire dans le modèle porcin d'HTP, nous avons fait une observation inattendue. En effet, nous avons observé que l'administration d'ECFC entraînait une diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes du VD. Pour rappel, l'hypertrophie du VD est une caractéristique de la dysfonction cardiaque présente en HTP. Suite à ces résultats intéressants, nous avons souhaité étudier plus en détail l'effet des ECFC issus de sang de cordon sur la modulation de l'hypertrophie de cardiomyocytes humains *in vitro*. Pour ce faire, nous avons induit l'hypertrophie de cardiomyocytes dérivés d'iPS (iCell Cardiomyocyte² Cellular Dynamics®) à l'aide d'endothéline-1. Une fois hypertrophiés, les cardiomyocytes ont été mis en contact avec du milieu conditionné d'ECFC préparé au préalable et l'évolution de l'hypertrophie a été étudiée.

Matériel et méthodes

Nous avons utilisé des cardiomyocytes dérivés d'iPS humains fournis par la société Cellular Dynamics® et déjà validés par de nombreuses publications. Ces cardiomyocytes sont issus d'une population stable et nous avons vérifié l'expression par ces cellules des principaux marqueurs des cardiomyocytes avant leur utilisation ([Figure 45](#)). Les cardiomyocytes dérivés d'iPS utilisés pour les expériences présentées ici sont issus d'un lot unique.

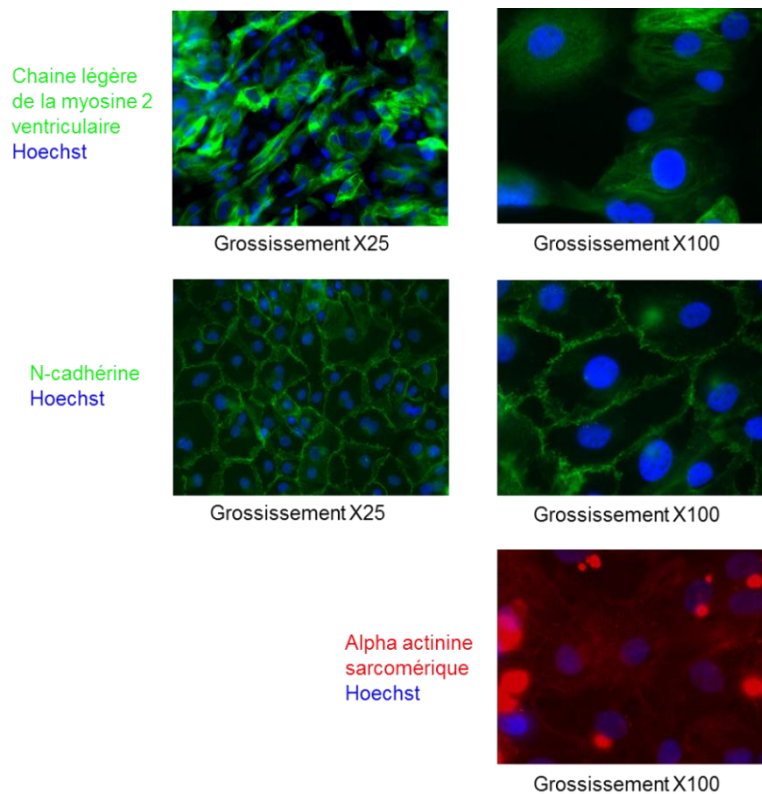


Figure 45 : Marquage immunofluorescent des cardiomyocytes. Ces images montrent les cardiomyocytes marqués pour les protéines suivantes : chaîne légère de la myosine 2 ventriculaire (1 : 200, ProteinTech 10906-1-AP), N-cadhérine (1 : 200, Abcam ab76057) et alpha sarcomérique actinine (1 : 200, Abcam ab9465) aux grossissements x25 ou x100 (microscope à fluorescence Leica DMR). Marquages par les anticorps secondaires donkey anti-mouse-647 (1 : 500, Invitrogen A-31571) et donkey anti-rabbit-488 (1 : 500, Invitrogen A-21206) et des noyaux par Hoechst (1 : 10000, Thermofisher 33342).

Dans un premier temps, une expérience de dose-réponse a été réalisée afin de déterminer la concentration optimale d'endothéline-1 induisant une réponse hypertrophique maximale. L'hypertrophie a été mesurée via le dosage de l'expression du pro Brain Natriuretic Peptide (proBNP), un marqueur de l'hypertrophie cardiaque. Le protocole d'induction de l'hypertrophie suivi est celui proposé par le fournisseur des cardiomyocytes, voir « Cellular Dynamics iCell Cardiomyocytes Application Protocol ». Le $\log(\text{EC}_{50})$, déterminé à partir de la courbe dose-réponse obtenue, permet d'obtenir cette concentration optimale. D'après la courbe ci-dessous (**Figure 46**), $\log(\text{EC}_{50}) = -10,49$ ce qui correspond à une concentration optimale d'endothéline-1 de 32 pM pour ce lot de cardiomyocytes. Par conséquent, cette concentration d'endothéline-1 a été utilisée pour le reste des expériences.

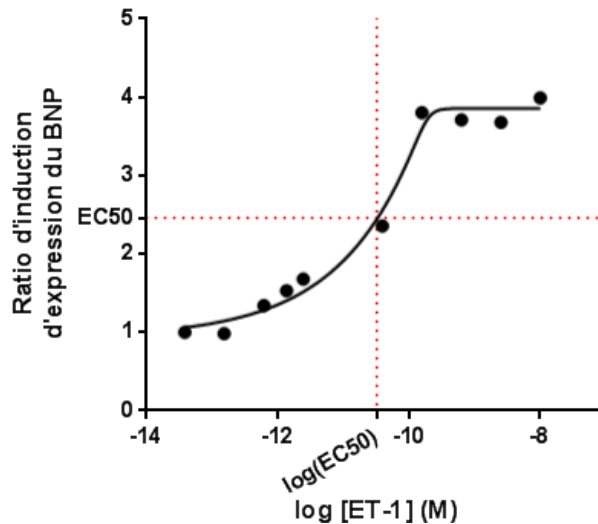


Figure 46 : Expression du BNP en réponse à différentes concentrations d'endothéline-1. Les cardiomyocytes ont été décongelés en plaque 96 puits dans du milieu de maintenance (Cellular Dynamics®), puis, 2 jours plus tard, le milieu a été changé pour débiter le protocole d'induction d'hypertrophie (milieu William's E supplémenté avec du cocktail B issu du milieu de maintenance des hépatocytes (Life Technologies)). L'endothéline-1 (E7764 Sigma) a ensuite été ajoutée pendant 18h aux différentes concentrations conseillées par le fournisseur en triplicat. L'expression de BNP a ensuite été analysée par cytométrie en flux (Accuri™ C6 BD Biosciences) à l'aide de l'anticorps primaire anti-proBNP (1 : 500, ab13115 Abcam) et du secondaire AF647 donkey anti mouse (1 :1000, Life Technologies, A31571). La courbe dose-réponse a été générée et donne l'EC50, ce qui permet de déterminer la concentration optimale d'endothéline-1. Ici $\log(\text{EC50}) = -10,49$ ce qui correspond à une concentration d'endothéline-1 de 32 pM.

En parallèle de cette mise au point, les milieux conditionnés ont été produits. Des ECFC de sang de cordon (Centre de Recherche Biologique, hôpital Saint-Louis) ont été cultivés dans différents types de milieu Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2) (Lonza) : EGM-2 sérum 5%, EGM-2 sérum 0.5%, EGM-2 sérum démicrovésiculé 5%, EGM-2 sérum démicrovésiculé 0.5%. Ce milieu a été récupéré 48h après, concentré 10 fois et conservé à -20°C (voir le détail **Figure 47**). Le sérum démicrovésiculé a été produit par la plateforme protéomique du laboratoire à l'aide de la technique d'ultrafiltration tangentielle (KrosFla Research Iii, Spectrum Laboratories), qui a pour caractéristique d'éviter l'accumulation des molécules à la surface du système de filtration grâce au balayage de cette surface par un flux continu de solution (brevet en cours).

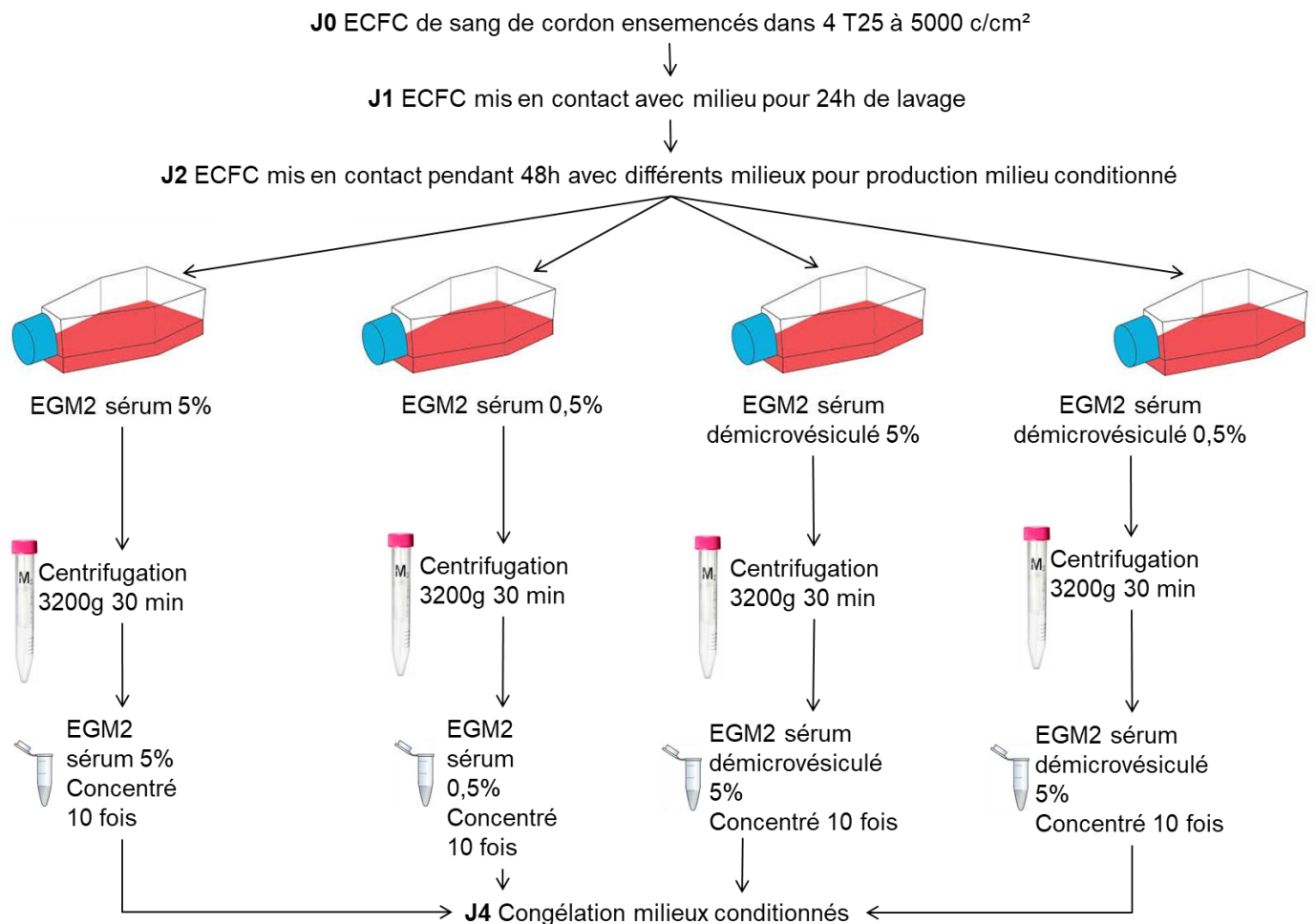


Figure 47 : Détail de la production des milieux conditionnés. Les ECFC de sang de cordon ont été ensemencés dans 4 flasques T25 à 5000 cellules/cm². Les cellules ont ensuite été mises en contact avec leur milieu respectif pendant 24h pour une phase de lavage. Au bout des 24h le milieu est enlevé et un nouveau milieu est ajouté : EGM-2 sérum 5%, EGM-2 sérum 0,5%, EGM-2 sérum démicrovésiculé 5% ou EGM-2 sérum démicrovésiculé 0,5%. Après 48h, le milieu est récupéré et concentré à l'aide de filtres à centrifuger Amicon Ultra 15 ml avec une membrane de 3kD (Merck Millipore), 3200g 30 min. Les milieux sont ainsi concentrés 10 fois puis conservés à -20°C avant leur utilisation.

Ces 4 types de milieux nous ont permis d'étudier l'effet de deux paramètres inhérents au sérum: (1) la concentration de celui-ci et (2) son contenu en microvésicules. Les ECFC cultivés dans un milieu contenant 0,5% de sérum sont en condition de stress. Cette condition a pour but de mimer le stress qu'elles subissent lorsqu'elles sont administrées dans le VD d'un porc HPPE. Nous pouvons ainsi comparer l'effet des facteurs sécrétés par les ECFC en condition normale (sérum 5%) et en condition de stress (sérum 0,5%) sur les cardiomyocytes

hypertrophiés. L'utilisation de sérum sans microvésicules permet d'évaluer spécifiquement l'effet des microvésicules produites par les ECFC sur l'hypertrophie des cardiomyocytes.

Une fois la concentration optimale d'endothéline-1 obtenue et les milieux conditionnés produit, une expérience de culture *in vitro* cardiomyocytes/milieu conditionné d'ECFC a été réalisée (Figure 48). Comme précédemment, les cardiomyocytes ont été décongelés puis, 2 jours plus tard, le milieu changé et l'endothéline-1 ajoutée. Dans cette expérience, l'hypertrophie a été induite pour toutes les conditions. Après induction de l'hypertrophie, les cardiomyocytes ont été mis en contact avec le milieu conditionné pendant 48h au ratio 50/50 (50% milieu d'induction de l'hypertrophie William's E+cocktail B et 50% milieu conditionné). Un ratio de milieu 50% milieu conditionné / 50% milieu cardiomyocyte a été choisi pour éviter que les cardiomyocytes ne soient en contact avec une quantité trop importante de milieu conçu pour la croissance des cellules endothéliales (EGM-2). Des cardiomyocytes hypertrophiés mis en présence de leur milieu de culture (Cellular Dynamics) ont servi de condition contrôle. L'expression du proBNP a ensuite été quantifiée par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps anti-proBNP. L'évolution de l'hypertrophie des cardiomyocytes au contact de milieu conditionné d'ECFC a ainsi pu être évaluée.

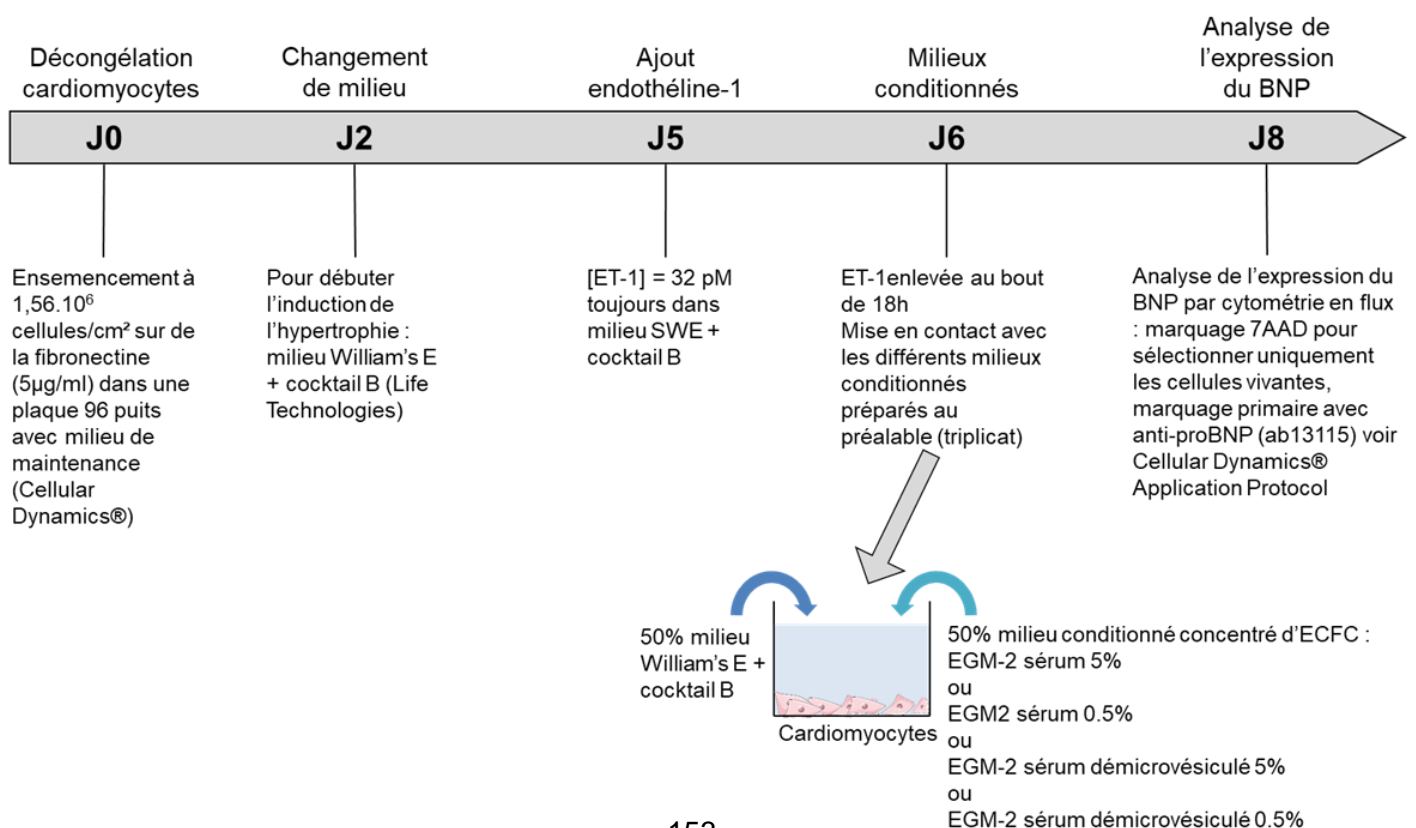


Figure 48 : Schéma expérimental de l'application de milieu conditionné d'ECFC sur des cardiomyocytes hypertrophiés. A J0 les cardiomyocytes sont ensemencés à une densité de $1,56.10^6$ cellules/cm² sur un coating fibronectine (5µg/ml, Roche) dans du milieu de maintenance (Cellular Dynamics®). A J2, le milieu est changé pour débiter l'induction de l'hypertrophie. A J5, de l'endothéline-1 à 32pM (concentration déterminée précédemment) est ajoutée au milieu. A J6, 18h après l'ajout de l'endothéline-1, les milieux sont changés pour mettre les milieux conditionnés pendant 48h. L'expression du BNP est finalement analysée par cytométrie en flux : anticorps primaire anti-proBNP (1 :1000, Abcam ab13115), anticorps secondaire AF647 donkey anti mouse (1 :1000, Life Technologies, A31571), marquage 7AAD pour déterminer la viabilité cellulaire, analyse sur Accuri™ C6 BD Biosciences.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons pu observer que l'ajout de milieu conditionné sur les cardiomyocytes a tendance à augmenter l'expression du proBNP par ces cellules par rapport à la condition contrôle (**Figure 49**). Il semblerait donc que les facteurs sécrétés par les ECFC ne diminuent pas l'hypertrophie des cardiomyocytes mais ont plutôt tendance à l'augmenter. Seul le milieu conditionné d'ECFC avec 0.5% de sérum démicrovésiculé induit une sécrétion de proBNP similaire à la condition contrôle (cardiomyocytes hypertrophiés cultivés dans leur milieu). Cependant, l'expression du proBNP n'est pas diminuée, il n'y a donc pas d'effet anti-hypertrophique du milieu conditionné 0.5% sérum démicrovésiculé.

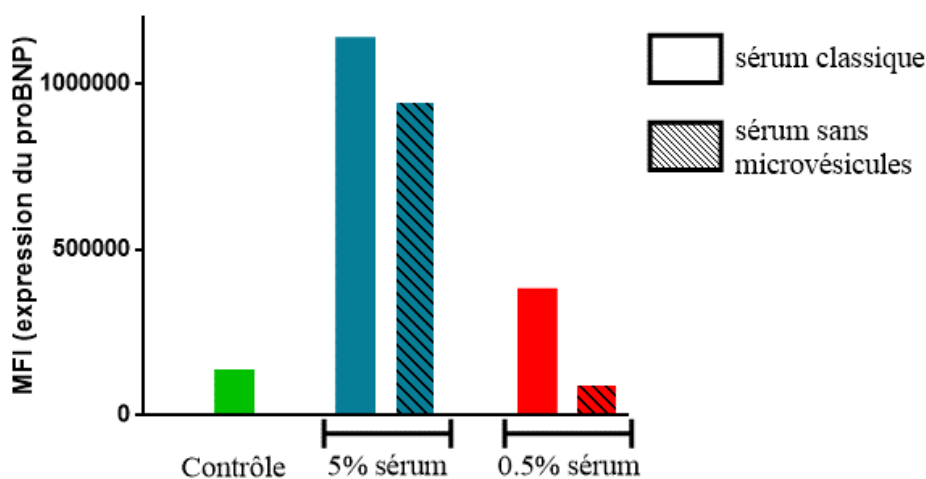


Figure 49 : Expression du proBNP par les cardiomyocytes en présence de milieu conditionné d'ECFC. L'expression a été analysée par cytométrie en flux, l'ordonnée représente l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de l'anticorps anti-proBNP présent dans les cardiomyocytes. Cette figure représente l'expression du proBNP dans des concentrations de sérum 5% (bleu) et 0.5% (rouge) dans du sérum classique (histogramme plein) et dans du sérum démicrovésiculé (histogramme hachuré). La condition contrôle (vert) correspond à des cardiomyocytes hypertrophiés cultivés dans leur milieu.

Etant donné que la condition « milieu conditionné d'ECFC avec 0.5% de sérum démicrovésiculé » (rouge hachuré) est la seule à induire une sécrétion de proBNP similaire à la condition contrôle (vert), nous avons mesuré la surface des cardiomyocytes à l'aide d'un marquage « Wheat germ agglutinin » (WGA) uniquement dans cette condition. Cette estimation indique une mesure de la surface des cardiomyocytes similaire entre les deux conditions (**Figure 50**).

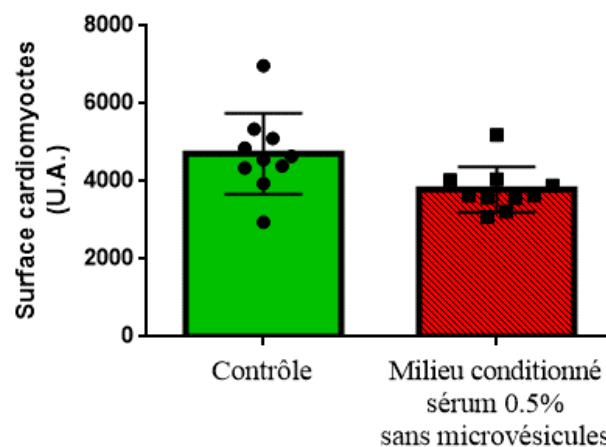


Figure 50 : Mesure de la surface des cardiomyocytes. La surface a été marquée par du WGA (WGA AF 488 W11261 Invitrogen, 5 µg/ml), les photos prises au microscope à fluorescence (Leica DMR) et le contour des cardiomyocytes a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ sur 10 champs par condition, au grossissement x25. Chaque point représente la moyenne de la surface des cardiomyocytes sur un champ et l'écart type entre les valeurs est représenté.

Conclusion/Discussion

Lors de cette étude très préliminaire, nous avons montré qu'il était possible d'induire l'hypertrophie de cardiomyocytes dérivés d'iPS et de leur appliquer du milieu conditionné d'ECFC. Dans un premier temps, la quantification de l'expression du BNP à différentes

concentrations d'endothéline-1 nous a permis de déterminer la concentration optimale d'endothéline à utiliser. Cependant, l'application de milieu conditionné d'ECFC, dans les conditions étudiées ici, n'entraîne pas de réversion l'hypertrophie des cardiomyocytes dérivés d'iPS *in vitro*. En effet, aucune des conditions ne permet de diminuer l'expression du proBNP analysée par cytométrie en flux, ni la surface des cardiomyocytes, mesurée à l'aide d'un marquage WGA. Au contraire, l'application de milieu conditionné d'ECFC a tendance à augmenter l'hypertrophie des cardiomyocytes.

D'après ces expériences préliminaires, il semblerait que la diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes, observée dans notre étude *in vivo* suite à l'administration d'ECFC par voie intracoronaire, ne soit pas induite par les facteurs sécrétés par les ECFC comme nous l'avons suggéré. Un autre mécanisme que la sécrétion de facteurs par les ECFC semble donc être à l'origine de notre observation *in vivo*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que des interactions directes entre cardiomyocytes et ECFC suite à l'injection de ces dernières aient permis de réverser l'hypertrophie. Il est aussi possible que la formation de vaisseaux par les ECFC ait engendré divers mécanismes aboutissant à la diminution de l'hypertrophie.

Cependant, il faut garder à l'esprit que l'expérience réalisée ici est très préliminaire et nécessite d'être reproduite afin d'être sûr des hypothèses que nous avançons. Seules des conditions en triplicat ont été réalisées ce qui ne permet pas une analyse statistique. Nous pouvons donc difficilement conclure avec cette seule expérience. Il serait nécessaire de faire d'autres expériences de co-culture directe cardiomyocytes/ECFC pour avoir une idée plus précise de l'action de ces dernières sur l'hypertrophie cardiaque.

Article n° 2 : Administration intracardiaque de progéniteurs endothéliaux dans un modèle porcin d'HPPE

Introduction

La dysfonction du VD est le principal facteur de pronostic dans l'HTP. Il a été reporté que la diminution de la densité capillaire du VD caractérise le passage d'un VD adapté à un VD désadapté et donc défaillant. Lors d'une première étude, nous avons administré des ECFC, cellules capables d'induire la réparation vasculaire et l'angiogenèse, par voie intracoronaire dans le VD de porcs modèles pour l'HPPE. Une amélioration de l'hémodynamique cardiaque, de la densité capillaire et une régression de l'hypertrophie avaient pu être observées. Cependant, cette voie d'administration avait révélé une faible rétention cellulaire au sein du myocarde. Nous avons donc choisi de réaliser des administrations intracardiaques pour pallier à cette faible prise de greffe des cellules.

Hypothèse

L'administration d'ECFC par voie intracardiaque dans le VD d'un modèle porcin d'HPPE pourrait induire une meilleure rétention cellulaire et des effets plus prononcés que suite à l'administration par voie intracoronaire droite.

Méthodes

Une étude préliminaire a été réalisée afin d'évaluer la faisabilité de l'administration intracardiaque dans le VD du modèle porcin d'HPPE. Dans ce cas, un porc a été sacrifié 24h après avoir reçu $10 \cdot 10^6$ ECFC administrés en 40 injections (10 par site, 4 sites marqués par un point) de 25 μ l chacune. Nous avons ensuite comparé 3 groupes : contrôle (n=6), HPPE (n=6) et HPPE+ECFC (n=6). Les ECFC ont été isolés à partir du sang périphérique des porcs du groupe HPPE+ECFC avant leur modélisation, pour une administration autologue. Le groupe contrôle a reçu du sérum physiologique. Après la mise en place du modèle, les groupes HPPE et HPPE+ECFC ont reçu respectivement du sérum physiologique et des

ECFC par injections dans le VD. L'hémodynamique pulmonaire et la fonction du VD ont été évaluées avant l'injection et quatre semaines plus tard. Les porcs ont été sacrifiés quatre semaines après l'administration et des biopsies cardiaques et pulmonaires ont été récupérées pour être analysées.

Résultats

L'étude préliminaire a permis de vérifier que les ECFC ont été correctement injectés dans le VD. Deux évènements indésirables ont été reportés lors des injections intracardiaques. Un des porcs est entré en fibrillation et a nécessité une réanimation. Un second porc a fait une tamponnade cardiaque. Les deux évènements ont pu être pris en charge à temps et les porcs sont entrés dans l'étude. Pour des raisons éthiques, deux porcs ont dû être sacrifiés à 3 jours et 5 jours après l'administration intracardiaque de sérum physiologique.

Quatre semaines après l'administration des ECFC, la comparaison des groupes n'a pas révélé de différence significative en ce qui concerne les paramètres hémodynamiques cardiaques ou pulmonaires. Une augmentation de la densité capillaire de manière très localisée ainsi qu'une diminution de la fibrose ont été observées suite à l'administration des ECFC.

N'ayant pas observé d'amélioration de la fonction cardiaque droite, nous avons réalisé une expérience supplémentaire afin de suivre le devenir des ECFC après leur administration. Chez un porc sain, nous avons prélevé du sang pour isoler ses ECFCs qui ont été transduit par des lentivirus afin d'exprimer la GFP. Ce porc a reçu 10 injections de $2.5 \cdot 10^6$ ECFC, dans 250 μ L de sérum physiologique, centralisées autour d'un point précis (marqué par un point de suture) chaque semaine et ce pendant 3 semaines. A la 4^{ème} semaine il a été sacrifié et des biopsies ont été prélevées aux sites d'injection. Nous avons pu retrouver des ECFCs dans le VD uniquement 1 semaine après leur administration. Trois semaines après administration les ECFC étaient retrouvés dans le lobe supérieur droit et dans la rate.

Conclusion

Il semblerait que l'administration intracardiaque des ECFC soit trop localisée pour engendrer une amélioration de la fonction cardiaque droite dans le modèle porcin d'HPPE étudié. De plus, à la vue des évènements indésirables qui se sont déroulés pendant et après les injections, le rapport bénéfice/risque de cette voie d'administration ne serait pas favorable dans le cas du VD en HPPE.

Text Word Count: 3025

Title: Effect of Intramyocardial Administration of Endothelial Colony Forming Cells on Right Ventricle Function in a Model of Pulmonary Hypertension

Authors: Fanny Loisel, MSc^{1,2}; Julien Guihaire, MD, PhD^{1,3}; David Boulate, MD, PhD^{1,4}; Myriam Amsallem, MD¹; Maria R. Ghigna, MD^{1,5}; Justin Issard, MD¹; Caroline Communaux, Eng⁵; Nassim Arouche, Eng²; Pierre Emmanuel Noly, MD, PhD¹; Benoît Decante, MSc¹; Elie Fadel, MD, PhD^{1,4,6}; Georges Uzan, PhD²; and Olaf Mercier, MD, PhD^{1,4,6}

- 1- Research and Innovation Unit, Inserm UMR-S 999, Marie Lannelongue Hospital, Paris-Saclay University, Le Plessis Robinson, France
- 2- Inserm 1197 Research Unit, 94807 Villejuif Cedex, France, Paris-Saclay University, France
- 3- Department of Cardiac Surgery, Marie Lannelongue Hospital, Paris-Saclay University, Le Plessis Robinson, France
- 4- Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital, Paris-Saclay University, DHU TORINO, Le Plessis Robinson, France
- 5- Department of Pathology, Marie Lannelongue Hospital, Paris-Saclay University, Le Plessis Robinson, France
- 6- Paris-Saclay University, School of Medicine, Kremlin-Bicêtre, France

Corresponding Author: Olaf Mercier, MD, PhD, Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Research and Innovation Unit, Marie Lannelongue Hospital, 133 Avenue de la Resistance, 92350, Le Plessis Robinson, France. Email: o.mercier@hml.fr

Abstract

Background: Right ventricular (RV) failure is the main prognostic factor in pulmonary hypertension (PH), and ventricular capillary density has been reported to be a marker of RV maladaptive remodeling and failure. Our aim was to determine whether intramyocardial administration of Endothelial Colony Forming Cells (ECFCs) can improve RV function and capillary density in a piglet model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension (CTEPH).

Methods: We compared three groups: Sham (n=5), CTEPH (n=6), and CTEPH+ECFC (n=5). ECFCs were isolated from CTEPH+ECFC piglet peripheral blood samples at baseline. CTEPH and Sham groups underwent intramyocardial administration of saline, while the CTEPH+EPC group received ECFCs at six weeks (T6). RV function, pulmonary hemodynamics, and myocardial morphometry were investigated in the animals at ten weeks (T10). Additional experiment has been performed to evaluate engraftment kinetics of ECFCs over 3 weeks.

Results: Following ECFCs administration, there were no significant changes in pulmonary or cardiac hemodynamic parameters (RVFAC, mPAP and TPR). However, CTEPH+ECFC piglets had increased localized capillary density and a reduction in myocardial fibrosis (CTEPH 13.15% [11.36-18.49] vs. CTEPH+ECFC 8.94 [5.25-10.98], $p=0.045$). ECFCs were found in the RV free wall at 24 h and one week after injection but no more after.

Conclusion: ECFCs intramyocardial administration did not improve right ventricle function in a model of CTEPH as it induced focalized capillary density improvement at injection site.

Intramyocardial route may not be the most effective way to deliver cell therapy to right ventricle in pulmonary hypertension.

Keywords: stem cell therapy, right ventricle in pulmonary hypertension, intramyocardial administration

Abbreviations

CTEPH: Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension

EGM: Endothelial cell Growth Medium

ECFCs: Endothelial Colony Forming Cells

FGF: Fibroblast Growth Factor

PA: pulmonary artery

PAP: Pulmonary Arterial Pressure

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PH: Pulmonary Hypertension

RUL: Right Upper Lobe

RV: Right Ventricular

RVFAC: Right Ventricular Fractional Area Change

T10: 10 weeks

T6: 6 weeks

TAPSE: Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion

TPR: Total Pulmonary Resistance

Introduction

Pulmonary hypertension (PH) is characterized by the occlusion of the pulmonary vasculature, leading to an increase in pulmonary vascular resistance and resulting in a rise in right ventricle (RV) afterload. While the disease progresses, the RV shifts from an adaptive remodelling to a maladaptive one. Right ventricular function is the main prognostic factor in PH [1]. The maladaptive state is defined by a decreased capillary density observed in several animals models and in patients [2] [3] [4] [5].

Endothelial Colony Forming Cells (ECFC) are good candidates for RV-targeted therapy since they promote vascular repair and angiogenesis [6] [7] [8]. Therefore, in a previous study, we administered ECFCs through the right coronary artery into the RV [9]. This study showed improved right heart function, increased capillary density and decreased cardiomyocytes' hypertrophy after ECFC administration. However, this route of administration led to a poor cell retention as ECFCs were not found in the RV 4 weeks after their administration. Intramyocardial administration is known to induce a better retention of transplanted cells than the intracoronary one and is often associated with a greater impact on the pathology [10].

As a result, we aimed at investigating the effect of ECFCs intramyocardial administration on RV function and capillary density in a piglet model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension (CTEPH).

Methods

Chronic thromboembolic piglet model

Five-week-old large white piglets, weighing 20-22 kg, were included in the preliminary (n=1), the main study (n=18) and the additional one (n=1). The animals were randomly assigned to Sham or CTEPH groups. Briefly, the CTEPH model was established by ligaturing the left pulmonary artery followed by weekly embolization of the right pulmonary artery over a five-week period [11] (See supplemental data for more detail).

A preliminary pilot study was undertaken using one CTEPH piglet in which ECFCs were administrated at six weeks (T6), and the animal was sacrificed 24 h later. This preliminary study was undertaken to test the feasibility, to validate the injection protocol and to evaluate the ECFCs' engraftment at 24h (**Fig 1a**). Eighteen piglets were included in the main study: 6 Sham, 6 CTEPH, and 6 CTEPH+ECFC (**Fig. 1a**). At T6, the animals in the CTEPH groups received intramyocardial injections of saline, whereas the animals in the CTEPH+ECFC group each received $10 \cdot 10^6$ ECFCs. On the RV, four sites were marked by stitches (**Fig. 1b**) and 10 injections of 25 μ l each were performed at each site, resulting in a total of 40 injections of 1 ml of either saline or cell suspension. An additional experiment was set in place to evaluate the engraftment of the ECFCs after their administration. To do so, one Sham piglet received $2.5 \cdot 10^6$ ECFCs (previously transfected by lentivirus to express GFP, See supplemental methods for more details) weekly during 3 weeks and was sacrificed at the end of the fourth week. Biopsies were collected at each site to look for the presence of ECFCs 1, 2 and 3 weeks post administration.

No deaths related to infection of the surgical site were reported. There were no deaths in the CTEPH+ECFC group after ECFC administration, and two deaths in the CTEPH group

after saline administration due to the severity of the disease. As a consequence, 2 additional animals has been enrolled in the study to have 6 piglets per group.

ECFC harvesting

Peripheral blood samples of 100 mL were collected from the CTEPH+ECFC piglets at baseline. An autologous cell-based therapy was established as the treated piglets received ECFCs isolated previously from their own blood. ECFCs were harvested by isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by gradient centrifugation in Pancoll (Dutsher, Burmath, France), after which they were plated at a density of 50,000 cells/cm² [12]. The PBMCs were maintained in endothelial basal medium-2 supplemented with EGM2 (Endothelial cell Growth Medium)-MV Single-Quots (containing hEGF, hydrocortisone, gentamicin, fetal bovine serum, VEGF, hFGF-B, R³-IGF-1, and ascorbic acid) (Lonza, Ermerainville, France) at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. After 8 to 15 days, cell colonies became visible and they were detached by trypsinization, followed by seeding at 10,000 cells/cm² for expansion.

ECFC administration

Cell therapy administration was performed at T6 for the CTEPH+ECFC group. This time point was chosen because it has been proven in the study of Mercier et al. that chronic PH is developed in pigs 5 weeks after left PA ligation and weekly embolization [12]. ECFC administration was performed under general anesthesia. Autologous ECFCs were resuspended in 1 mL of saline solution in a syringe, and injected using 30 G needle and a mesotherapy pistol to accurately deliver 25 µl at each injection. Injection sites were marked beforehand in order to localize these areas at the time of RV biopsies sampling 4 weeks later.

Hemodynamic assessment

Heart rate, mean pulmonary artery pressure (mPAP), cardiac output, and central blood saturation were measured at baseline (T0), 6 weeks (T6), and 10 weeks (T10). A pressure-volume loop analysis of the RV was performed at T6 and T10 with a conductance VentriCath 507 (Millar Instruments, Houston, TX, USA). (See supplemental methods for more details).

Echocardiographic assessment

Transthoracic echocardiography (Vivid E9; GE Medical Systems Milwaukee, WI, USA) was performed at T0, T6, and T10. Right ventricular fractional area change (RVFAC) and the RV free wall strain were assessed.

Capillary density assessment in the RV

To assess the capillary density, RV samples were incubated with a rabbit anti-human CD31 (CD31 clone 1A10, 1:100, Diagnostics, Blagnac, France) detected by ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, California USA) staining with Benchmark GX (Roche, Boulogne-Billancourt, France). The capillary density was determined by the number of capillaries per mm² in 10 fields of view for each animal at 400x (NIS-Element software, Nikon, Tokyo, Japan).

Cardiomyocyte area assessment in the RV

RV samples were incubated with wheat germ agglutinin (WGA-AF488, Invitrogen, USA, 10 µg/mL) and DAPI (1:10,000, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). The cardiomyocyte surface was determined, as previously described [13] using ImageJ software in 10 fields of view for each animal at 630x (NIS-Element software, Nikon).

Statistical analysis

Data from the three groups were compared with the Kruskal-Wallis test, and the groups were compared two by two with the Mann-Whitney test in case of a significant Kruskal-Wallis test. The results are presented as medians [interquartile range (IQR)]. Statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad® software, San Diego, California, USA).

Results

Preliminary study

The aim of the preliminary study was to evaluate the feasibility of right intramyocardial administration of ECFCs in piglets and to check that ECFCs were properly recovered in the RV tissue. A CTEPH piglet was sacrificed 24 hours after receiving $10 \cdot 10^6$ ECFCs through several intramyocardial injections. Immunohistological analysis revealed the presence of ECFCs in the RV myocardium (**Fig. 2a**).

ECFC engraftment

An additional experiment consisted in weekly administrations of ECFCs during 3 weeks to follow their engraftment week-by-week. Isolated GFP-ECFCs were found in the RV only one week after their administration (**Fig. 2b**). These cells are in the RV myocardium. GFP-ECFCs were not detected in this tissue at 2, 3 and 4 weeks post administration. Some ECFCs were found in the spleen (**Fig. 2c**) and lung right upper lobe (**Fig. 2d**) 3 and 4 weeks after their intramyocardial administration.

Assessment at six weeks (T6)

There was no significant difference in terms of body weight, body surface area, and hemodynamic data (mPAP, TPR, cardiac output, RVFAC, RV free wall strain) between the CTEPH and CTEPH+ECFC groups at T6 (data not shown).

Events occurring during and after intramyocardial administration

During intramyocardial administration, one event of fibrillation occurred in a piglet receiving ECFC and required intensive care. Furthermore, tamponade happened in one piglet after saline solution injection. In both cases, adverse events were rapidly identified and successfully managed. For ethical reasons, 2 piglets had to be sacrificed at 3 and 5 days after intramyocardial administration of saline solution because of the severity of the disease. They showed serious symptoms of right ventricular dysfunction and a strongly altered pulmonary hemodynamic (TPR_i was 1488 dynes.s.cm⁻⁵ and 2074 dynes.s.cm⁻⁵ ; and mPAP 54 mmHg and 52 mmHg).

RV function and pulmonary hemodynamics

At T10, RVFAC was not significantly different between the three groups (Sham 35.37% [34.15-50.76], CTEPH 31.83% [29.1-55.86] and CTEPH+ECFC 37.87% [25.69-50.87]). There were no difference either for RV free wall strain (Sham -21.08 [-23.77- -18.19], CTEPH -25.54 [-31.44- -18.08] and CTEPH+ECFC -27.26 [-29.25 - -21.94]). In regard to pulmonary hemodynamics, both the mPAP and the TPR indexed to the body surface area remained significantly lower in the Sham group compared to both the CTEPH group and the CTEPH+ECFC group (mPAP: 13 mmHg [8.25-15.5], 26 mmHg [20.5-33.75], and 27 mmHg [22.75-33.5], respectively, Sham vs. CTEPH p=0.0136 and Sham vs. CTEPH+ECFC p=0.0081 ; TPR: 280 dynes.s.cm⁻⁵ [204.1-347.6], 570.3 dynes.s.cm⁻⁵ [504.5-680.3], and 707.3 dynes.s.cm⁻⁵ [522-1246], respectively, Sham vs. CTEPH p=0.045 and Sham vs. CTEPH+ECFC p=0.0062). These hemodynamic parameters did not significantly differ

between the CTEPH group and CTEPH+ECFC group (for mPAP: $p>0.999$ and for TPR: $p>0.999$) (data not shown).

RV and lung morphometry

The cardiomyocyte surface area was not different between the three groups (Sham 210.1 μm^2 [200.6-268.4], CTEPH 235.5 μm^2 [210.9-258.5] and CTEPH+ECFC 219.3 μm^2 [147.7-337.7]). The pulmonary artery media thickness in the RUL was greater in the CTEPH group (64.35% [58.51-66.51]) and the CTEPH+ECFC group (63.72% [53.97-69.78]) compared to the Sham group (25.11% [23-27.42]), (CTEPH vs. Sham $p=0.0148$, CTEPH+ECFC vs. Sham $p=0.0074$), while there was no significant difference between the CTEPH and the CTEPH+ECFC animals ($p>0.999$) (data not shown).

RV capillary density

After ECFC intramyocardial administration, localized increase in capillary density was revealed by CD31 immunohistochemical analysis (**Fig. 3a**). Indeed, clusters with increased capillary density were observed. When the three groups were compared, the analysis revealed a higher capillary density (capillary/ mm^2) in the CTEPH group (189.7 [173.5-225.3]) and CTEPH+ECFC group (208.7 [181.6-253.3]) compared to the Sham group (134.6 [128.6-142]) (CTEPH vs. Sham $p=0.0175$ and CTEPH+ECFC vs. Sham $p=0.0062$) (**Fig. 3b**). There was no significant difference between CTEPH+ECFC and CTEPH regarding the overall capillary density ($p>0.999$).

RV fibrosis

Red Sirius analysis showed a general increase in fibrosis in the CTEPH group (13.15% [11.36-18.49]) compared to the Sham group (8.45% [5.55-10.46]) ($p=0.0284$). Interestingly, the fibrosis was lower in the CTEPH+ECFC group (8.94% [5.29-10.98]) compared to CTEPH

group ($p=0.045$). There was no significant difference between the Sham group and the CTEPH+ECFC group ($p=0.66$) (**Fig. 3c**). In this case, unlike capillary density, the decreased fibrosis in the CTEPH+EPC group is general and not present in the form of cluster.

Discussion

We first set in place a preliminary study to evaluate the safety and the feasibility of the method because it is an invasive one. This preliminary study allowed validation of our technic of administration. Indeed, we used it to ensure that ECFC were well administered in the myocardium. After observing that ECFC were injected into the RV, we begun the main study. Four weeks after ECFC administration an increased capillary density in the area of injection and a general decrease of fibrosis were observed. However, no hemodynamic and RV function improvements were noticed.

In this study, 2 piglets were lost after intramyocardial injections due to the severity of the disease. Furthermore, 2 adverse events occurred during injections (ventricular fibrillation and tamponade). In a previous study we administered ECFCs in CTEPH piglets through the intracoronary route and had no adverse event reported [9]. Based on these results, we can state that intramyocardial administration has a higher risk and invasiveness than the intracoronary route of administration for the CTEPH piglet model. However, a clinical trial administering mesenchymal stromal cells through transendocardial injection in patients with severe ischaemic heart failure observed no side events and stated that this route of administration was safe [14]. Furthermore, in another study, van der Spoel et al. observed no differences in safety profiles between transendocardial and intracoronary cell injection [15]. However, transendocardial route cannot be directly compared to intramyocardial administration, because the first one is percutaneous and the second one requires an invasive surgical

procedure. Transendocardial administration may be less invasive and less lethal than the intramyocardial one due to the percutaneous access. As a result, if an intramyocardial injection is intended, the transendocardial route seems less invasive and safer than the epicardial one. Nevertheless it is likely that this route of administration would not have improved our results, because the administration would still be localized in clusters.

The histological analysis 24 hours after ECFC administration showed clusters of cells entering the myocardium along the needle route attesting that the administrations were localized in the tissue. Four weeks after the injections, localized areas of increased capillary density were observed in the RV. However, we did not observe a general increase in capillary density in the RV. It is important to highlight that even if there is no sustained ECFC engraftment, a localized effect was observed. In contrast, Kawamoto et al. observed an increased capillary density in the left ventricle after transendocardial administration in a pig model of myocardial ischemia [16]. Our observation may be explained by two hypotheses. First, we did not observe a general increase in capillary density because we had already an increased capillary density in this CTEPH model as compared to the Sham animals. The lack of a decreased capillary density in our model, like in the RV of PH patients, is one of the major limitations of our study. There may be a slight increase in capillary density after ECFC administration that we were not able to quantify. The second hypothesis is that we did not inject the optimal cell dose (ie number of cells/injection or number of injections). In this study $10 \cdot 10^6$ ECFCs were administered per piglet. The other studies that administered stem cells in the myocardium through direct intramyocardial injections used a highly variable number of cells (from $5 \cdot 10^6$ to $8 \cdot 10^8$) [17]. However, studies that used increasing doses of cells have come to different conclusions. Some showed a beneficial effect only when a high dose of cells was administered while others found a reverse dose-response: the highest doses are the least effective [18] [19]. It appeared that the concentration of the cells during administration rather

than their number affected the cardiac tissue [20] [18]. Finally, these studies were targeting the left ventricle where we worked on the RV. These two ventricle are slightly different and can lead to different results.

A decrease in fibrosis was noticed after ECFC administration. Other studies observed this effect after ECFC administration in different animal models of myocardial dysfunction [16] [21] [22]. However, none of them described the pathway through which ECFC succeeded in reversing myocardial fibrosis. Fibroblast growth factor (FGF) secreted by ECFCs may be an explanation [23]. Hu et al. observed that the treatment of mice with FGF16 attenuated interstitial fibrosis in response to myocardial infarction [24]. However, it seems that the effect of FGFs on cardiac fibrosis depends on the type of FGF and potentially the model of injury [25]. Further work is needed to identify the FGFs pathways implicated.

As stated above, we observed a localized increase in capillary density and a general decrease of fibrosis after ECFC intramyocardial administration. These two observations seem contradictory but we can hypothesize that the localized increased capillary density allowed a better diffusion of the factors secreted by the administered ECFC. These secreted factors could exert their effect in the tissue in a diffuse way, resulting in a general decrease of fibrosis.

The histological analysis 24 hours after ECFC administration revealed clusters of cells entering the myocardium which showed that the administration was localized in the tissue. In addition, we observed a localized improvement of capillary density. A clinical trial pointed that cells administered through transendocardic route had only an effect at the injection sites [26]. The right ventricular dysfunction in PH does not seem localized on specific areas of the RV and is rather a general dysfunction. In this study, it seems that the injections were too localized in view of the general dysfunction of the RV. That may be why no improvements had been observed in RV function. As a result, it seemed that the intramyocardial ECFC

administration did not induce a significant improvement of the right ventricular function in CTEPH. However, this route of administration is beneficial in the case of localized dysfunction such as the ones that appeared in the left ventricle after myocardial infarction. Indeed, in this case, the intramyocardial administration of stem cells in the ischemic area or in the ischemic border can overcome the deleterious effects of the infarction [14].

After observing no significant effect on RV function, an additional study was performed to evaluate the ECFCs engraftment over time. Histological analysis reveal the presence of GFP-ECFCs only one week after their administration. None of the ECFCs injected were found in the RV beyond one week. Even if intramyocardial administration leads to a better cell retention than the intracoronary delivery, the retention remains low [10]. Administering cells using a needle lead to a significant cell loss that could be attributed to different parameters : the trypsinization, the passage of the cells through the needle, the inflammation caused by the needle at the injection site and the damaged tissue where they are administered result in a low cell survival [27] [28]. Furthermore, a study showed that cells are rapidly wash out from the myocardium through the venous system after intramyocardial administration [29]. This observation can explain the fact that after 4 weeks ECFCs were found in the RUL and spleen in our study.

In this study, as we verify that the ECFC were well administered in the targeted RV, it seems that these cells triggered a local increase in capillary density. However this local effect was too weak to lead to a general improvement in RV function.

Conclusion

Intramyocardial cell administration is invasive, requires a lot of stem cells and did not lead to an improved cardiac function in our study. As a result, the benefit/risk ratio of ECFCs intramyocardial administration in the RV of CTEPH piglets seems to be inefficient. Thus, this

route of administration may not be optimal for RV in PH. The use of endothelial progenitor cells is promising but requires improvements of the route of administration. The use of biomaterial may be more efficient than intracoronary or intramyocardial ones and should be further studied.

Conflicting Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding, acknowledgements: This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the second 'Investissement d'Avenir' program (reference: ANR-15-RHUS-0002).

References

- [1] S. Ghio *et al.*, « Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 37, n° 1, p. 183-188, janv. 2001.
- [2] P.-E. Noly, P. Dorfmueller, E. Fadel, et O. Mercier, « Capillary density in right ventricular myocardium in congenital heart disease », *J. Heart Lung Transplant.*, déc. 2018.
- [3] P.-E. Noly *et al.*, « The importance of Capillary Density/Stroke Work Mismatch for Right Ventricular adaptation to Chronic Pressure Overload », *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 0, n° 0, juin 2017.
- [4] J. J. Ryan et S. L. Archer, « The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure », *Circ. Res.*, vol. 115, n° 1, p. 176-188, juin 2014.
- [5] G. Sutendra *et al.*, « A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a

- decompensated state in pulmonary hypertension », *J. Mol. Med.*, vol. 91, n° 11, p. 1315-1327, nov. 2013.
- [6] T. Murohara *et al.*, « Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization », *J. Clin. Invest.*, vol. 105, n° 11, p. 1527-1536, juin 2000.
- [7] A. Flex *et al.*, « Human cord blood endothelial progenitors promote post-ischemic angiogenesis in immunocompetent mouse model », *Thromb. Res.*, vol. 141, p. 106-111, mai 2016.
- [8] X.-G. Peng, Y. Bai, J. R. James, D. P. Shlapak, et S. Ju, « Transplanted Endothelial Progenitor Cells Improve Ischemia Muscle Regeneration in Mice by Diffusion Tensor MR Imaging », *Stem Cells Int*, vol. 2016, p. 3641401, 2016.
- [9] F. Loisel *et al.*, « Autologous Endothelial Progenitor Cell Therapy Improves Right Ventricular Function in a Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension », *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 0, n° 0, sept. 2018.
- [10] B. Vrtovec *et al.*, « Comparison of transendocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy », *Circulation*, vol. 128, n° 11 Suppl 1, p. S42-49, sept. 2013.
- [11] O. Mercier *et al.*, « Piglet model of chronic pulmonary hypertension », *Pulm Circ*, vol. 3, n° 4, p. 908-915, déc. 2013.
- [12] V. Vanneaux *et al.*, « In vitro and in vivo analysis of endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application? », *Cell Transplant*, vol. 19, n° 9, p. 1143-1155, 2010.
- [13] J. G. Bensley, R. De Matteo, R. Harding, et M. J. Black, « Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections », *Sci Rep*, vol. 6, p. 23756, avr. 2016.
- [14] A. B. Mathiasen *et al.*, « Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial) », *Eur. Heart J.*, vol. 36, n° 27, p. 1744-1753, juill. 2015.
- [15] T. I. G. van der Spoel *et al.*, « Transendocardial cell injection is not superior to intracoronary infusion in a porcine model of ischaemic cardiomyopathy: a study on delivery efficiency », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 16, n° 11, p. 2768-2776, nov. 2012.
- [16] A. Kawamoto *et al.*, « Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia », *Circulation*, vol. 107, n° 3, p. 461-468, janv. 2003.
- [17] C. C. Sheng, L. Zhou, et J. Hao, « Current stem cell delivery methods for myocardial repair », *Biomed Res Int*, vol. 2013, p. 547902, 2013.
- [18] J. M. Hare *et al.*, « Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial », *JAMA*, vol. 308, n° 22, p. 2369-2379, déc. 2012.
- [19] R. Wu, X. Hu, et J. Wang, « Concise Review: Optimized Strategies for Stem Cell-Based Therapy in Myocardial Repair: Clinical Translatability and Potential Limitation », *Stem Cells*, vol. 36, n° 4, p. 482-500, avr. 2018.
- [20] S. Golpanian *et al.*, « Concise Review: Review and Perspective of Cell Dosage and Routes of Administration From Preclinical and Clinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease », *Stem Cells Transl Med*, vol. 5, n° 2, p. 186-191, févr. 2016.
- [21] Y. Cheng *et al.*, « Transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates myocardial interstitial fibrosis and cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats », *Int. J. Mol. Med.*, vol. 30, n° 4, p. 870-876, oct. 2012.

- [22] A. C. Gaffey *et al.*, « Injectable shear-thinning hydrogels used to deliver endothelial progenitor cells, enhance cell engraftment, and improve ischemic myocardium », *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 150, n° 5, p. 1268-1276, nov. 2015.
- [23] C. Urbich *et al.*, « Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 39, n° 5, p. 733-742, nov. 2005.
- [24] Y. Hu *et al.*, « FGF-16 protects against adverse cardiac remodeling in the infarct diabetic heart », *Am J Transl Res*, vol. 9, n° 4, p. 1630-1640, 2017.
- [25] L. Maddaluno, C. Urwyler, et S. Werner, « Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair », *Development*, vol. 144, n° 22, p. 4047-4060, 15 2017.
- [26] V. Y. Suncion *et al.*, « Does transendocardial injection of mesenchymal stem cells improve myocardial function locally or globally?: An analysis from the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis (POSEIDON) randomized trial », *Circ. Res.*, vol. 114, n° 8, p. 1292-1301, avr. 2014.
- [27] D. Skuk, M. Goulet, et J. P. Tremblay, « Intramuscular transplantation of myogenic cells in primates: importance of needle size, cell number, and injection volume », *Cell Transplant*, vol. 23, n° 1, p. 13-25, janv. 2014.
- [28] E. Abdelwahid, A. Kalvelyte, A. Stulpinas, K. A. T. de Carvalho, L. C. Guarita-Souza, et G. Foldes, « Stem cell death and survival in heart regeneration and repair », *Apoptosis*, vol. 21, n° 3, p. 252-268, mars 2016.
- [29] F. van den Akker *et al.*, « Intramyocardial stem cell injection: go(ne) with the flow », *Eur. Heart J.*, vol. 38, n° 3, p. 184-186, janv. 2017.

Figure legends

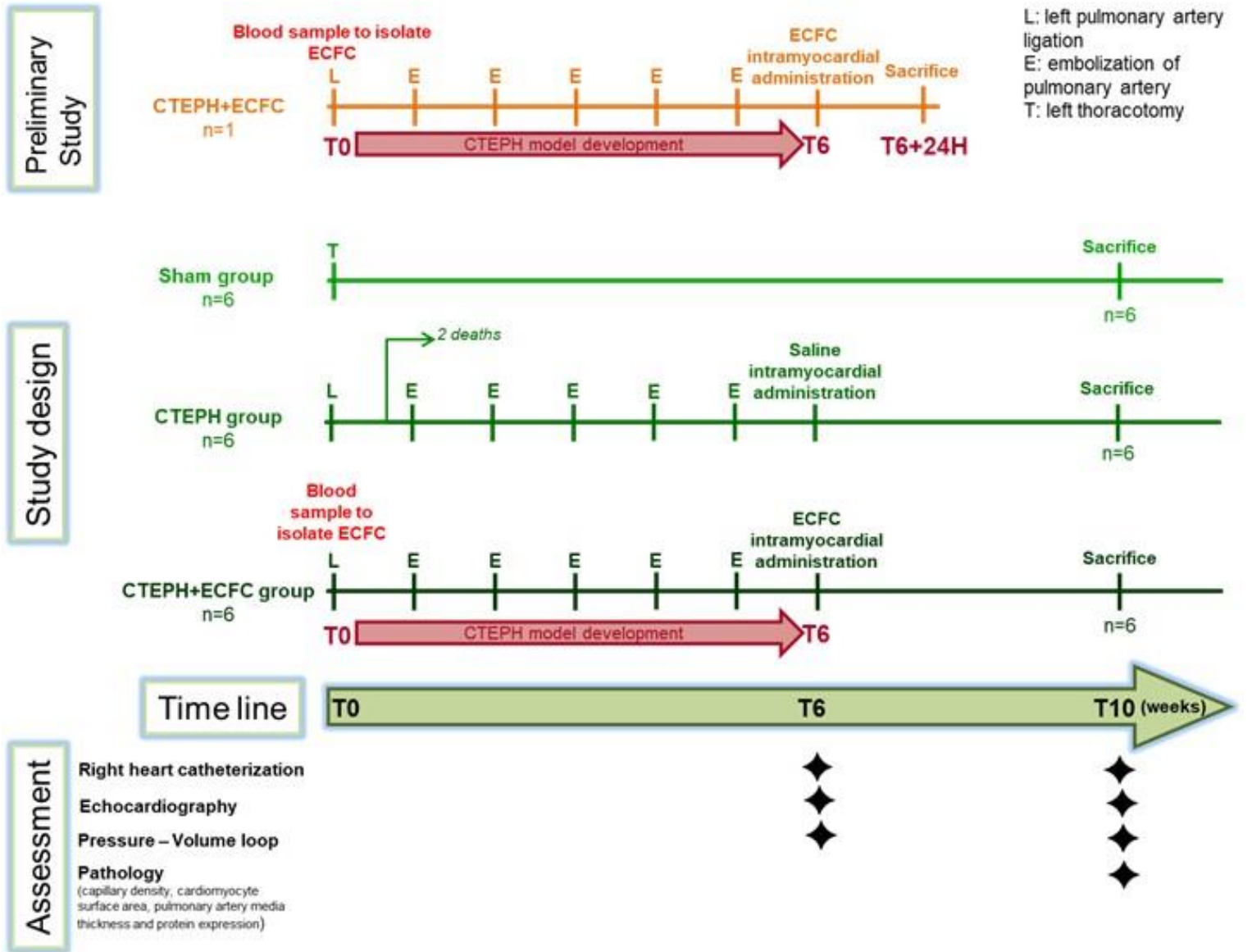
Figure 1: (A) Study design. (B) Stitches on RV free wall to mark the localization of intramyocardial administration.

Figure 2: (A) ECFC found in the RV 24h after their intramyocardial administration (anti-CD31 labelling). (B) Isolated GFP-ECFCs found in the RV 1 weeks after administration (anti-GFP labelling). GFP-ECFCs were also detected in the right upper lobe (C) and the spleen (D) 4 weeks after their administration.

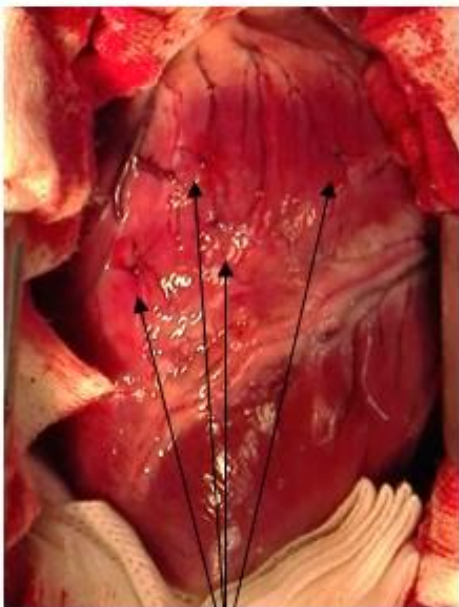
Figure 3: (A) Cluster of higher capillary density in the RV 4 weeks after ECFC administration. (B) CD31 labelling showed a higher capillary density in both CTEPH and CTEPH+ECFC groups compared to the Sham group. (C) Red Sirius staining revealed an increased fibrosis in the RV of CTEPH piglets compared to the Sham group. Fibrosis is decreased in the CTEPH+ECFC group.

Figure 1

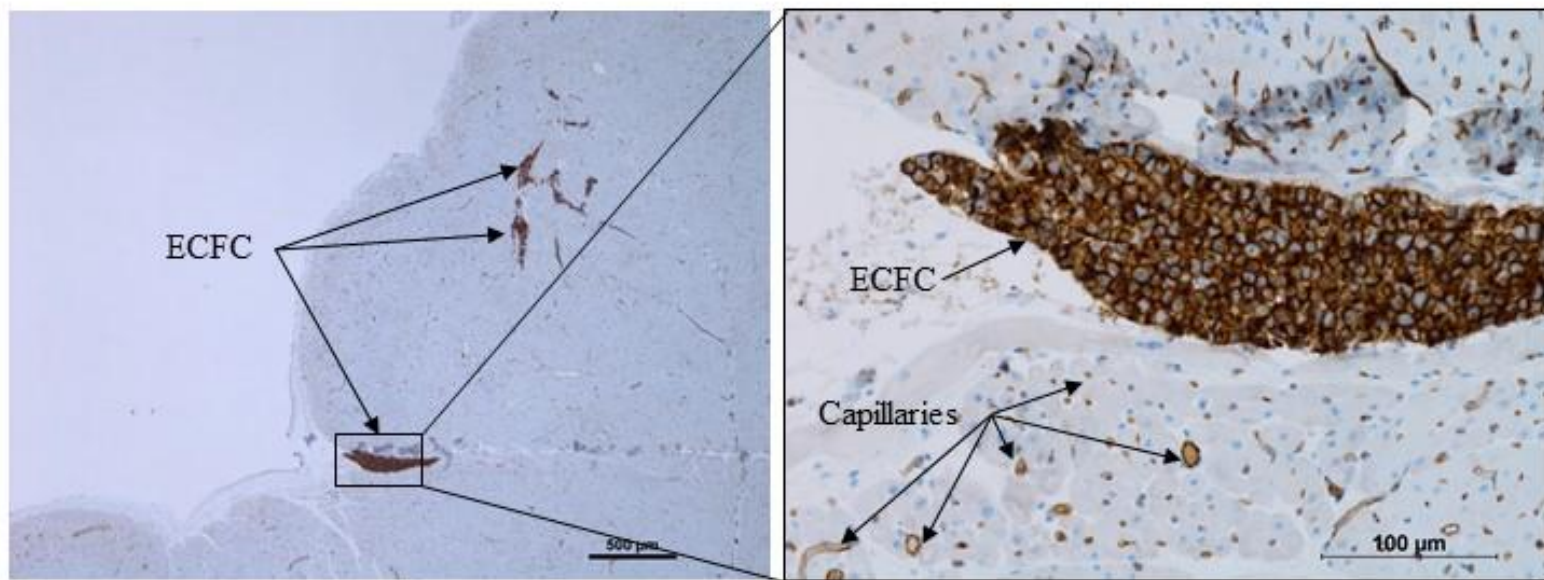
A



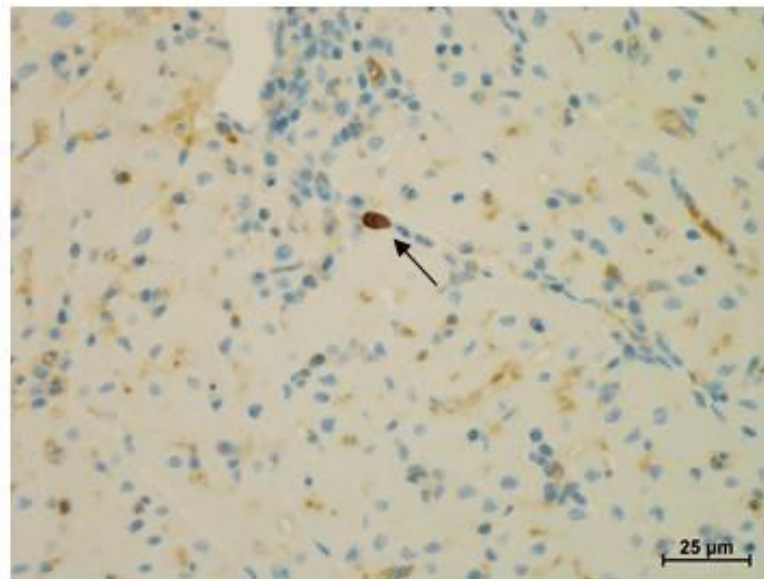
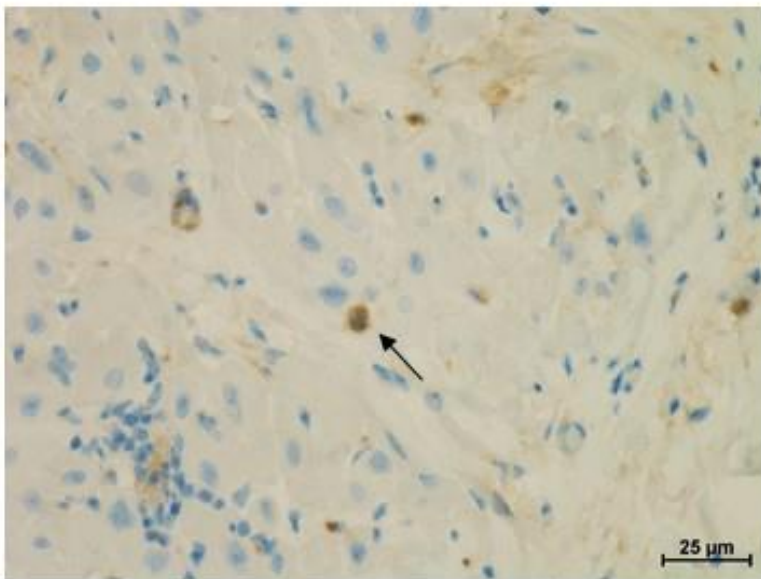
B



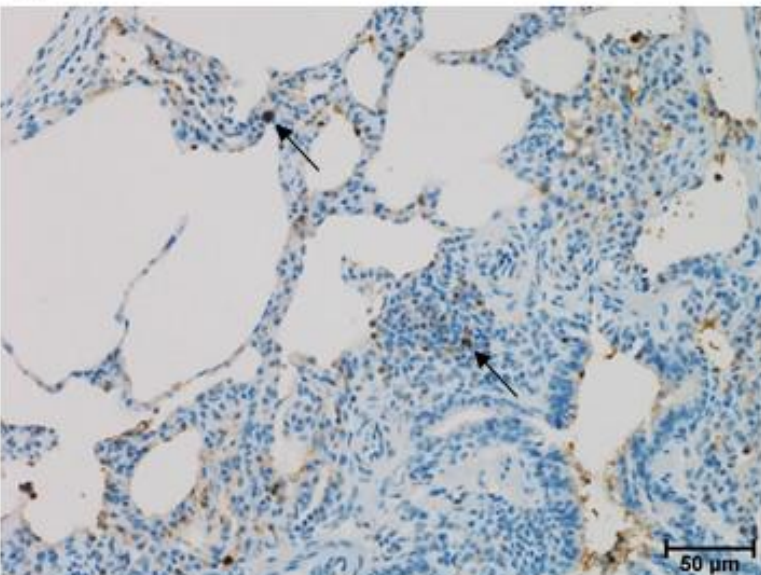
4 stitches on the RV free wall

A

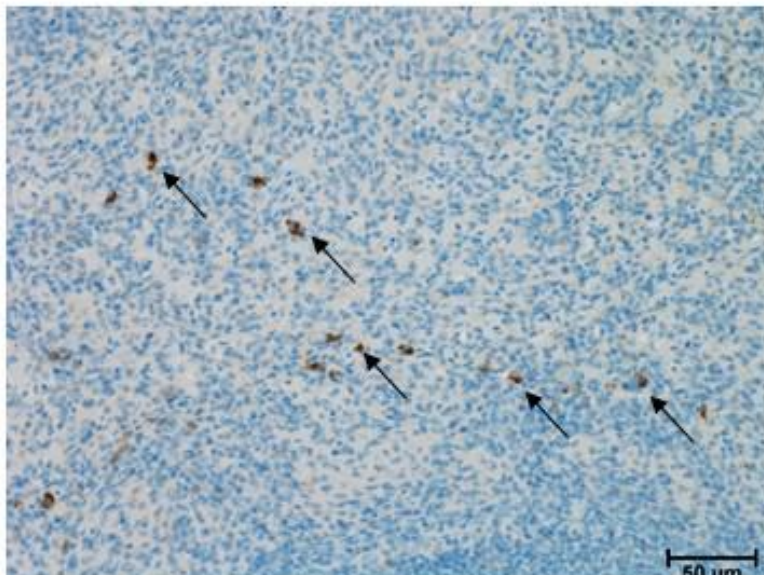
RV 24h

B

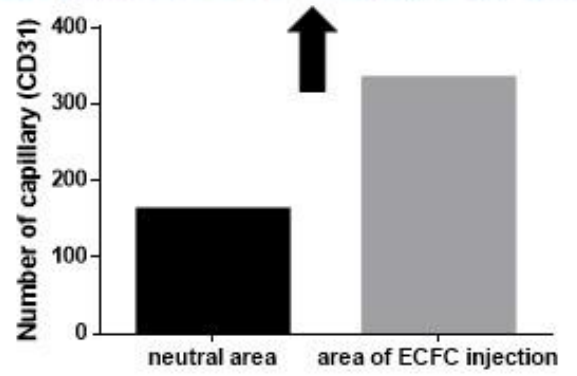
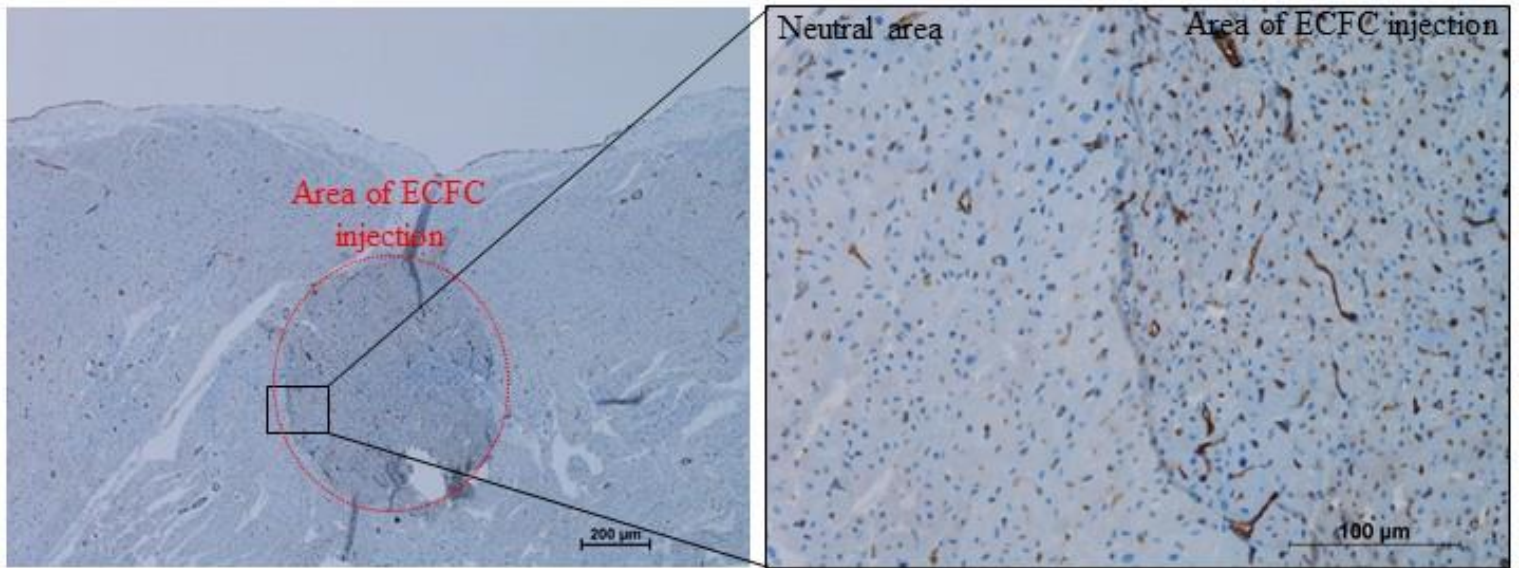
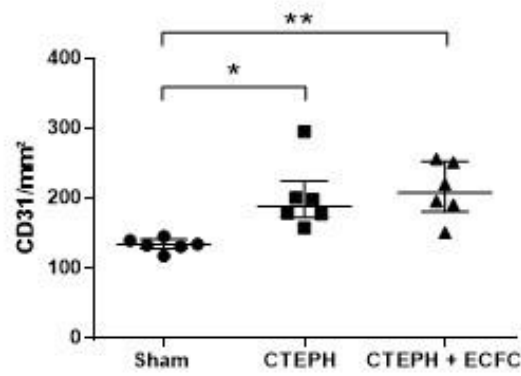
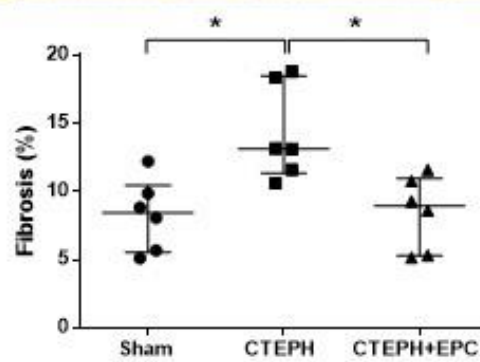
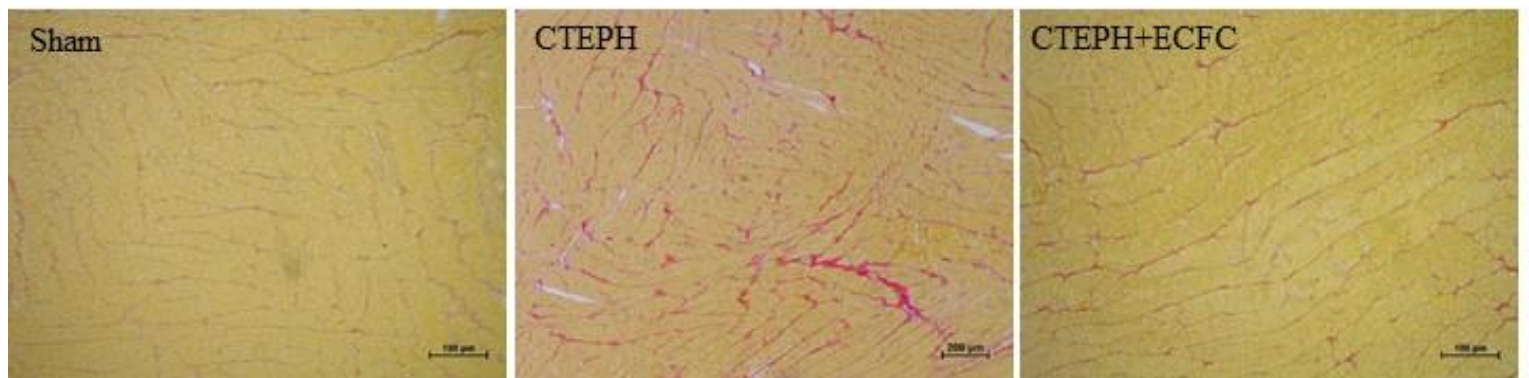
RV 1 week

C

Right upper lobe 3 weeks

D

Spleen 3 weeks

A**B****C**

Administration de progéniteurs endothéliaux circulants par patch

L'objectif de cette thèse était d'observer l'effet de l'administration d'ECFC au niveau du VD chez un modèle porcin d'HTP. Etant donné que nous avons étudié les voies intracoronaire et intracardiaque, nous souhaitons aborder l'administration par patch qui est en plein essor. Cependant, nous n'avons pas eu suffisamment de temps pour analyser en détail cette voie d'administration. Les résultats présentés ci-dessous sont donc préliminaires. Dans la mesure où cette thèse s'est concentrée principalement sur les voies intracoronaire et intracardiaque, l'étude sur les patches s'est effectuée en 2 temps et est présentée en ordre chronologique.

Des patches composés de polysaccharides (pullulane et dextrans) préparés par l'équipe du Dr Letourneur ont été utilisés ([Figure 51_A](#)). Les patches sont poreux (42 μm en moyenne), déshydratés et peuvent être de toutes les formes ou tailles souhaitées.

Dans une première partie de l'étude, les ECFC ont été ensemencés dans les patches en réhydratant ceux-ci avec du milieu contenant les cellules à l'aide d'une pipette. Les ECFC s'organisent en amas dans cette structure poreuse ([Figure 51_B](#)). Dans un premier temps, l'objectif était de déterminer la viabilité des ECFC de sang périphérique porcin dans ces patches. La viabilité a été étudiée 48h après ensemencement par un marquage « live/dead » au microscope confocal qui a révélé que les cellules en périphérie des amas sont vivantes, tandis que celles au centre sont mortes, probablement à cause du manque d'accès aux nutriments et à l'oxygène ([Figure 51_C](#)). Un test apoptose/nécrose (annexine 5/iodure de propidium) par cytométrie en flux a permis d'avoir une idée plus précise de la proportion de cellules mortes dans les patches. Il indique qu'entre 24h et 48h après ensemencement, le pourcentage d'ECFC apoptotiques double presque (de 16,7% à 24h à 29,3% à 48h) ([Figure 51_D](#)). Il semblerait donc qu'un séjour prolongé dans le patch induise une apoptose des cellules.

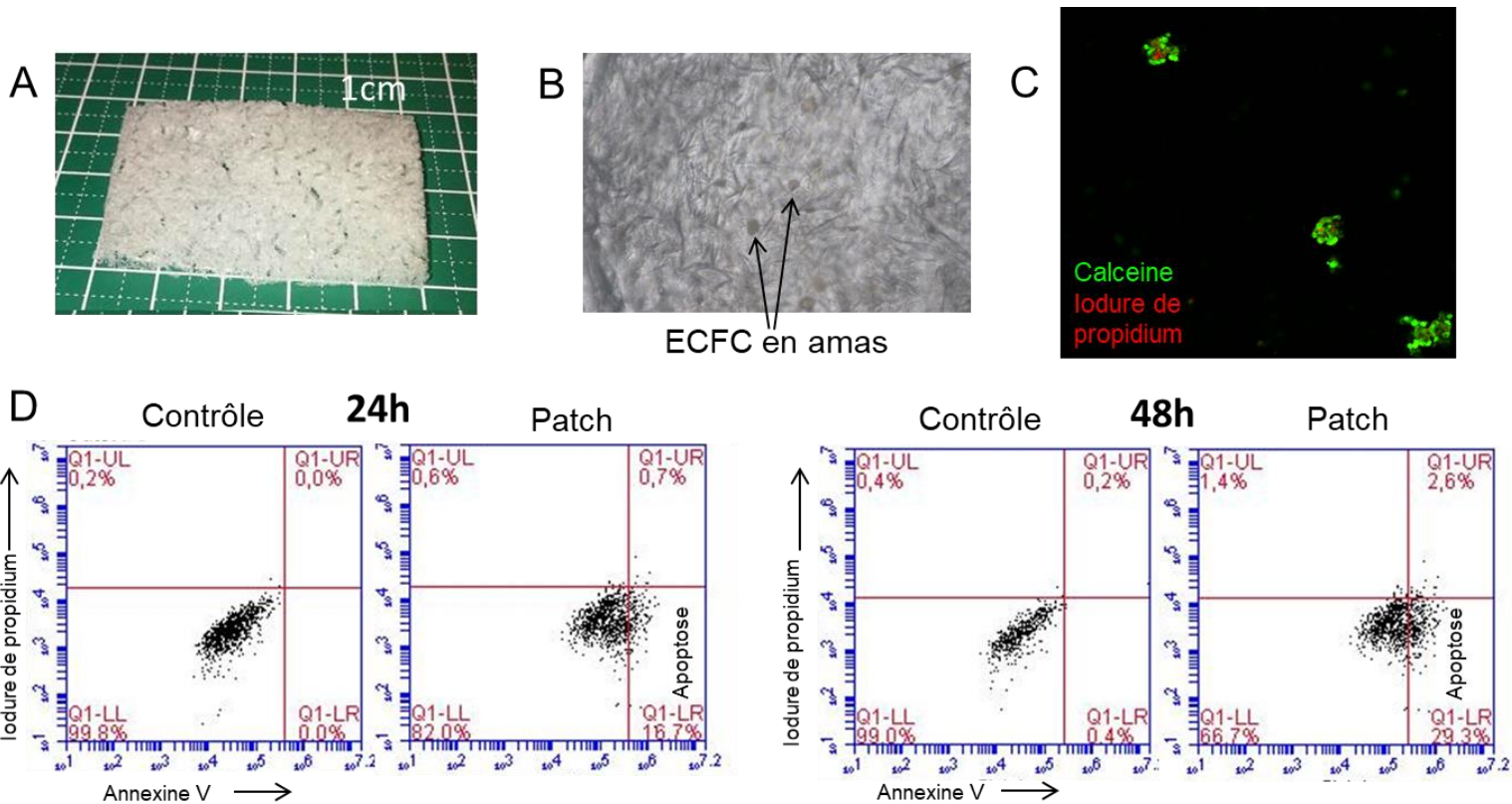


Figure 51 : Ensemencement et viabilité des ECFC dans le patch. A : Patch poreux composé de polysaccharides. B : Amas d'ECFC dans un patch. C : Marquage « live/dead » des ECFC présents dans le patch depuis 48h. Marquage réalisé à l'aide de calceïne AM (25 µg/ml, C3100MP Thermofisher) et d'iodure de propidium (1 µg/ml, issu du kit apoptose V13242, Thermofisher). L'image a été prise à l'aide du microscope confocal Leica TCS SP5 au grossissement x20. Seules les cellules au centre de l'amas sont marquées par l'iodure de propidium et sont donc mortes. D : Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux à l'aide du marquage annexine 5/iodure de propidium (protocole selon le fournisseur du kit V13242, Thermofisher). Les ECFC ayant été cultivés classiquement en puits de culture ont servi de contrôles. L'autre condition consiste en des ECFC ensemencés dans un patch pendant 24h ou 48h. Après être restés dans le patch pendant 48h, 29,3% des ECFC sont en apoptose tandis qu'après 24h, seuls 16,7% des ECFC le sont.

En se basant sur ces résultats, il a été choisi de poser le patch contenant les ECFC de porc sur le VD d'un porc sain pendant 48h avec pour objectif premier de voir si les cellules allaient migrer vers le cœur. Initialement, le but était de faire adhérer le patch sur le VD (**Figure 52 A**) à l'aide de nanoparticules de fer tricarboxylé préparées par Teresa Simon-Yarza de l'équipe du Dr Letourneur. Il avait déjà été démontré que ces nanoparticules permettaient l'adhésion de ce type de patch pendant au moins 3 jours sur le cœur battant d'un modèle murin d'infarctus du myocarde (Meddahi-Pellé et al. 2014). Malgré tout, même avec l'expertise de

cette équipe, l'application n'a pas été un succès. Les patches posés se sont tous rétractés au contact du liquide péricardique et n'ont donc pas adhérents au cœur (Figure 52 B). L'étude a été poursuivie sur un autre porc sain en utilisant une autre méthode permettant l'adhésion du patch au cœur : l'application d'une éponge hémostatique, le Tachosil® (composé de collagène, thrombine, fibrinogène et albumine) par-dessus le patch. Un patch de 4x4 cm, ensemencé avec 13 millions d'ECFC marqués par un colorant fluorescent et resuspendus dans du sérum physiologique contenant 2% de sérum de porc, a été posé sur le cœur puis recouvert de Tachosil® (Figure 52 C). Le porc a été sacrifié 48h après et des biopsies de VD ayant été en contact avec le patch ont été congelées pour des études histologiques (Figure 52 D). Il s'avère que toutes les cellules n'ont pas incorporé le colorant fluorescent car il est possible d'observer des noyaux sans marquage cellulaire alentour (Figure 52 E). Il semblerait que les ECFC n'aient pas migré vers le cœur car les quelques cellules marquées ont été retrouvées uniquement dans le patch (Figure 52 F). Pour poursuivre l'étude, il a été proposé d'augmenter la densité des ECFC dans le patch.

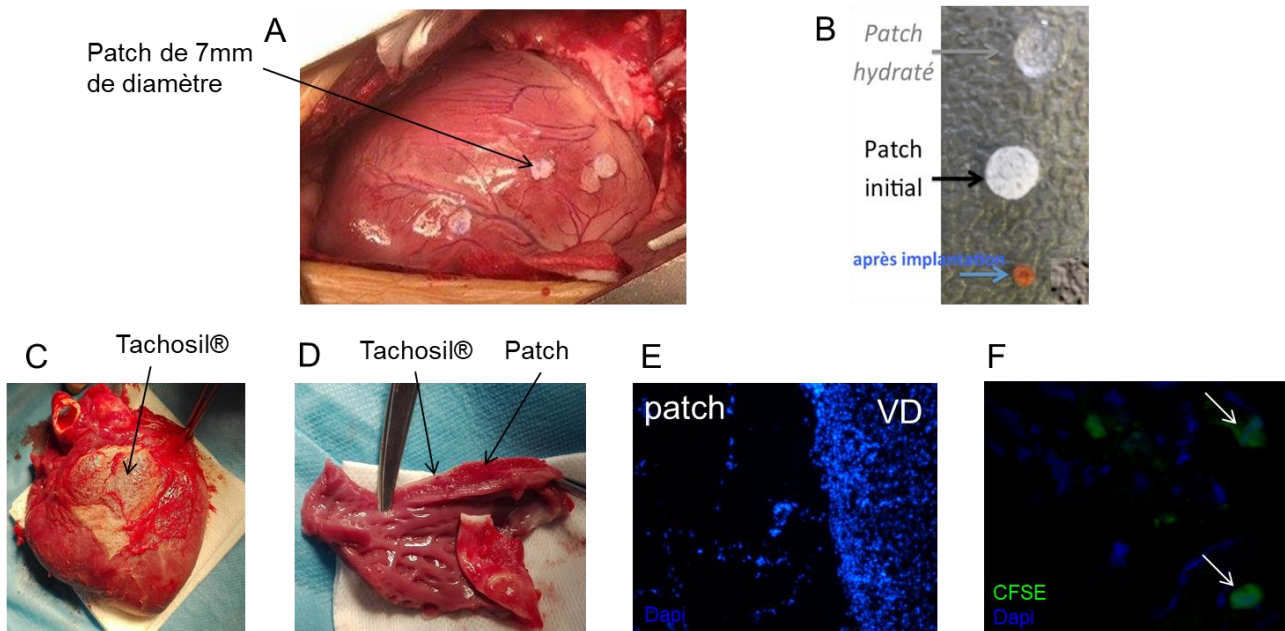


Figure 52 : Pose d'un patch ensemencé avec des ECFC sur le VD. A : Patches de 7 mm de diamètre apposés sur le VD d'un porc sain à l'aide de nanoparticules de fer tricarboxylé. B : Photo de patch avant hydratation (patch initial), d'un patch hydraté et d'un patch ayant été hydraté et apposé sur le VD à l'aide de nanoparticules mais qui n'a pas adhéré et qui a été récupéré. Ce dernier s'est considérablement rétracté par rapport au patch hydraté (image fournie par Dr Letourneur). C : Cœur

de porc sain explanté 48h après la pose du patch qui est situé sous le Tachosil®. D : Biopsie de VD, coupe transverse permettant d'observer le tissu myocardique, le patch et le Tachosil®. E : Coupe représentant le patch posé sur le VD (grossissement x25). Le tissu du VD est facilement repérable par la forte densité de noyaux marqués au Dapi. On retrouve des ECFC dans le patch mais ils ne sont pas marqués alors qu'avant d'être ensemencés, les ECFC avaient été marqués par la Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, 0,5 μ M, Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit V12883 Thermofisher). F : Image d'ECFC retrouvés dans le patch 48h après qu'il ait été apposé sur le VD d'un porc sain (grossissement x63). Les flèches blanches indiquent la présence d'ECFC-CFSE dans le patch. Images prise à l'aide du microscope à fluorescence Leica DMR.

Ceci nous amène à la seconde partie de l'étude où une méthode optimisée d'ensemencement a été employée. Brièvement, les patchs sont mis dans une seringue de 20 ml puis les cellules en suspension sont ajoutées. La seringue est obstruée et à l'aide de mouvements avec le piston, par un mécanisme de vide d'air, tout le milieu contenant les cellules va être absorbé par les patchs. Il y a ainsi moins de perte cellulaire et une répartition plus homogène du milieu contenant les cellules dans le patch. Les cellules s'organisent toujours en amas dans les patchs de polysaccharides (Figure 53 A et B). La viabilité des cellules a de nouveau été établie par marquage « live/dead » et annexine 5/iodure de propidium comme précédemment. Les cellules au cœur des amas sont aussi retrouvées mortes tandis que celles en périphérie sont vivantes (Figure 53 C). Un test apoptose/nécrose (annexine 5/iodure de propidium) par cytométrie en flux a révélé que, 24h après ensemencement, le pourcentage d'ECFC apoptotiques est de 22,1% (Figure 53 D). Malgré tout, comme dans la première partie de l'étude la pose du patch pendant 48h n'avait pas été concluante quant à la migration des cellules, nous avons décidé dans cette seconde partie de laisser le patch posé pendant 7 jours.

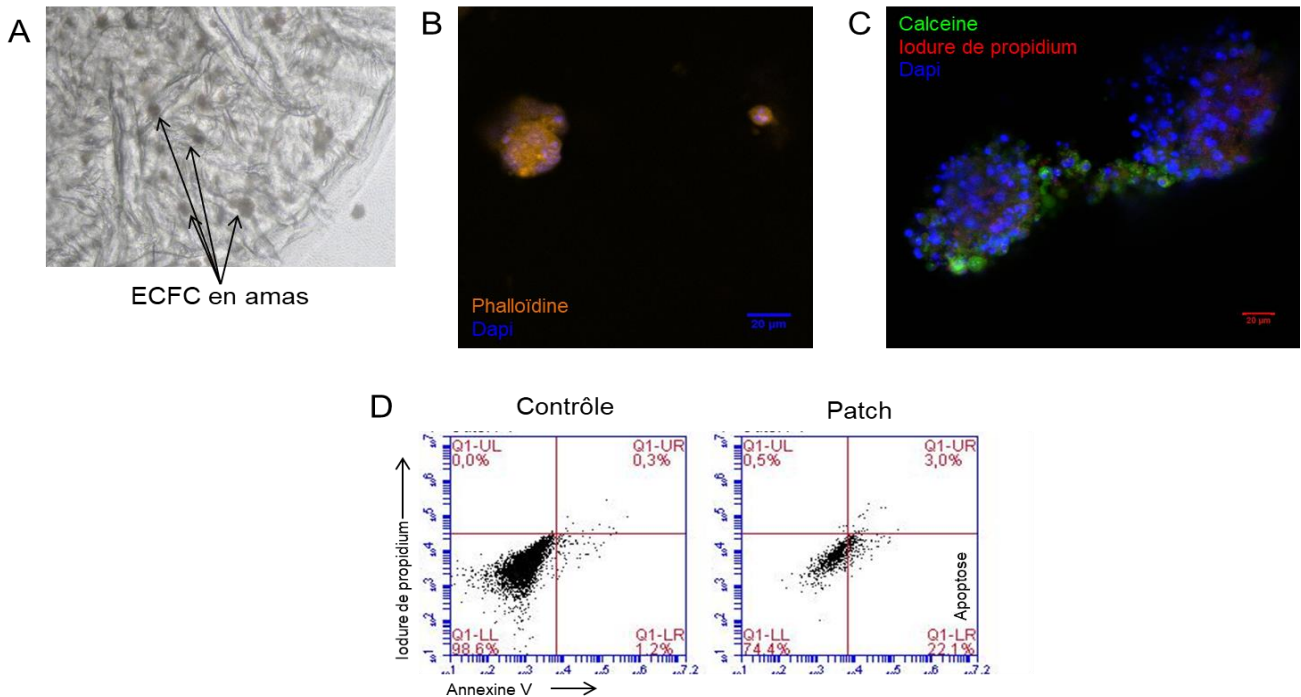


Figure 53 : Nouvelle méthode d'ensemencement des ECFC dans le patch et survie des cellules. A : Amas d'ECFC dans un patch. B : Amas d'ECFC ensemencés dans un patch depuis 48h puis marqués phalloïdine (Phalloidin-TRITC 25 µg/ml, P1951 Sigma) pour mettre en évidence l'actine et au Dapi (1 : 10000) pour révéler les noyaux. C : Marquage « live/dead » des ECFC présents dans le patch depuis 48h. Marquage réalisé à l'aide de calceïne AM (25 µg/ml, C3100MP Thermofisher) et d'iodure de propidium (1 µg/ml, issu du kit apoptose V13242, Thermofisher). L'image a été prise à l'aide du microscope confocal Leica TCS SP5 au grossissement x60. Seules les cellules au centre de l'amas sont marquées par l'iodure de propidium et sont donc mortes. D : Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux à l'aide du marquage annexine 5 / iodure de propidium (protocole selon le fournisseur du kit V13242, Thermofisher). Les ECFC ayant été cultivées classiquement en puits de culture ont servis de contrôles. L'autre condition consiste en des ECFC ensemencées dans un patch pendant 48h. Après être restés dans le patch pendant 48h, 22,1% des ECFC sont en apoptose.

Dans cette seconde partie, nous souhaitons optimiser l'utilisation d'un porc modèle pour l'HTP et donc répondre à plusieurs objectifs sur une seule expérience. Des patches de différentes tailles ensemencés avec des ECFC exprimant la GFP ou non ont été apposés sur le VD d'un porc HPPE pendant 7 jours. Le tableau suivant indique les objectifs fixés ainsi que les expériences mises en place pour y répondre.

Objectifs	Méthodes
1- Observer si les ECFC ensemencés dans un patch migrent vers le VD dysfonctionnel	Pose patch (4 x 3 x 3 cm) avec 17.10^6 ECFC GFP Après 7 jours : <ul style="list-style-type: none"> - récupération du patch pour rechercher les ECFC au microscope confocal - récupération de biopsies de VD sous le patch pour rechercher l'expression de la GFP sur coupe histologique, en ARN et en protéine
2- Observer si les ECFC ensemencés dans un patch ont un effet sur le VD dysfonctionnel	Pose patch (2 x 2 x 3 cm) avec $7,5.10^6$ ECFC Après 7 jours : <ul style="list-style-type: none"> - récupération du patch pour regarder si les ECFC présents expriment toujours leurs marqueurs caractéristiques - récupérer biopsies VD sous le patch pour étudier la densité capillaire, la surface des cardiomyocytes...
3- Observer si les ECFC ensemencés dans un patch sont toujours vivants 7 jours après que le patch ait été déposé	Pose patch (10 mm Ø) avec 5.10^5 ECFC Après 7 jours : <ul style="list-style-type: none"> - récupération du patch pour faire un marquage « live/dead » à analyser au microscope confocal

Pour tenter de répondre à tous ces objectifs, nous avons donc posé les patches tels que sur la figure suivante (Figure 54).

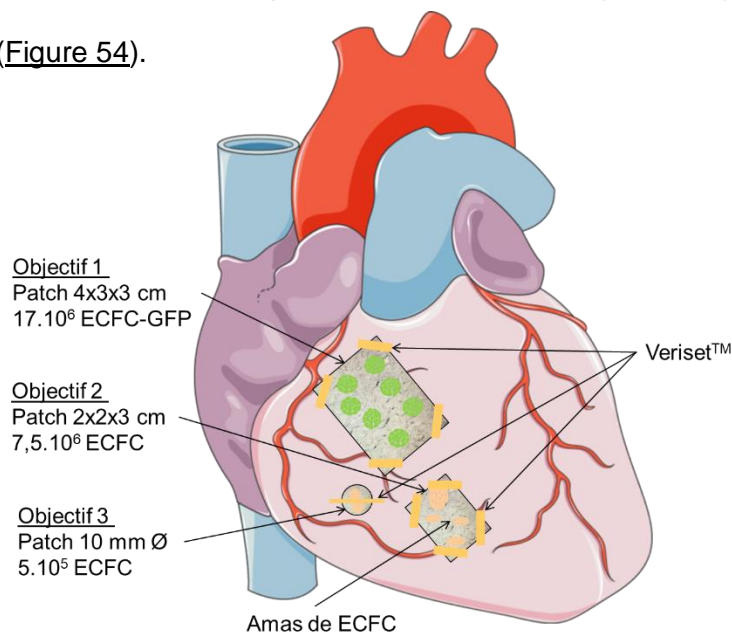


Figure 54 : Schéma représentant la disposition des patches sur le VD d'un porc modèle pour l'HTP. Les ECFC ont été resuspendus dans du sérum physiologique contenant 2% de sérum de porc avant d'être ensemencés dans le patch à l'aide d'une seringue comme décrit ci-dessus. Une partie des ECFC a été transduite avec des lentivirus (217LPP-EGFP-LV156-025-C Tebu-bio), ce qui a permis l'intégration de la GFP au génome des cellules. L'expression de la GFP a été vérifiée par cytométrie en flux avant administration. Les extrémités des patches ont été recouvertes de Veriset™, un patch hémostatique permettant de maintenir les patches de polysaccharides contenant les ECFC posés sur le VD.

Cependant, après 7 jours, les patchs n'étaient plus visibles et le Veriset™ à peine distinguable (Figure 55 A). Il n'a donc pas été possible de récupérer les patchs pour étudier les ECFC présents et leur survie (objectifs 2 et 3). Seules des biopsies de VD aux endroits présumés où les patchs étaient présents ont été collectées (Figure 55 B). Des coupes histologiques de VD ont révélé la formation d'un tissu inflammatoire en réaction au patch (Figure 55 D). Il est possible que cette réaction inflammatoire ait induit la résorption du patch, étant donné qu'on y retrouve des cellules et des capillaires (Figure 55 C). Il a été démontré que ces patchs sont biodégradables lorsqu'ils sont implantés sur un myocarde infarci (Le Visage et al. 2012). Il est donc fort probable que, dans notre cas, nous observons le début de la dégradation du patch par les lymphocytes T. Le début de cette dégradation permet aux cellules présentes dans le patch d'être incorporées dans le tissu cardiaque. Cependant, nous sommes à un temps trop précoce pour faire cette observation.

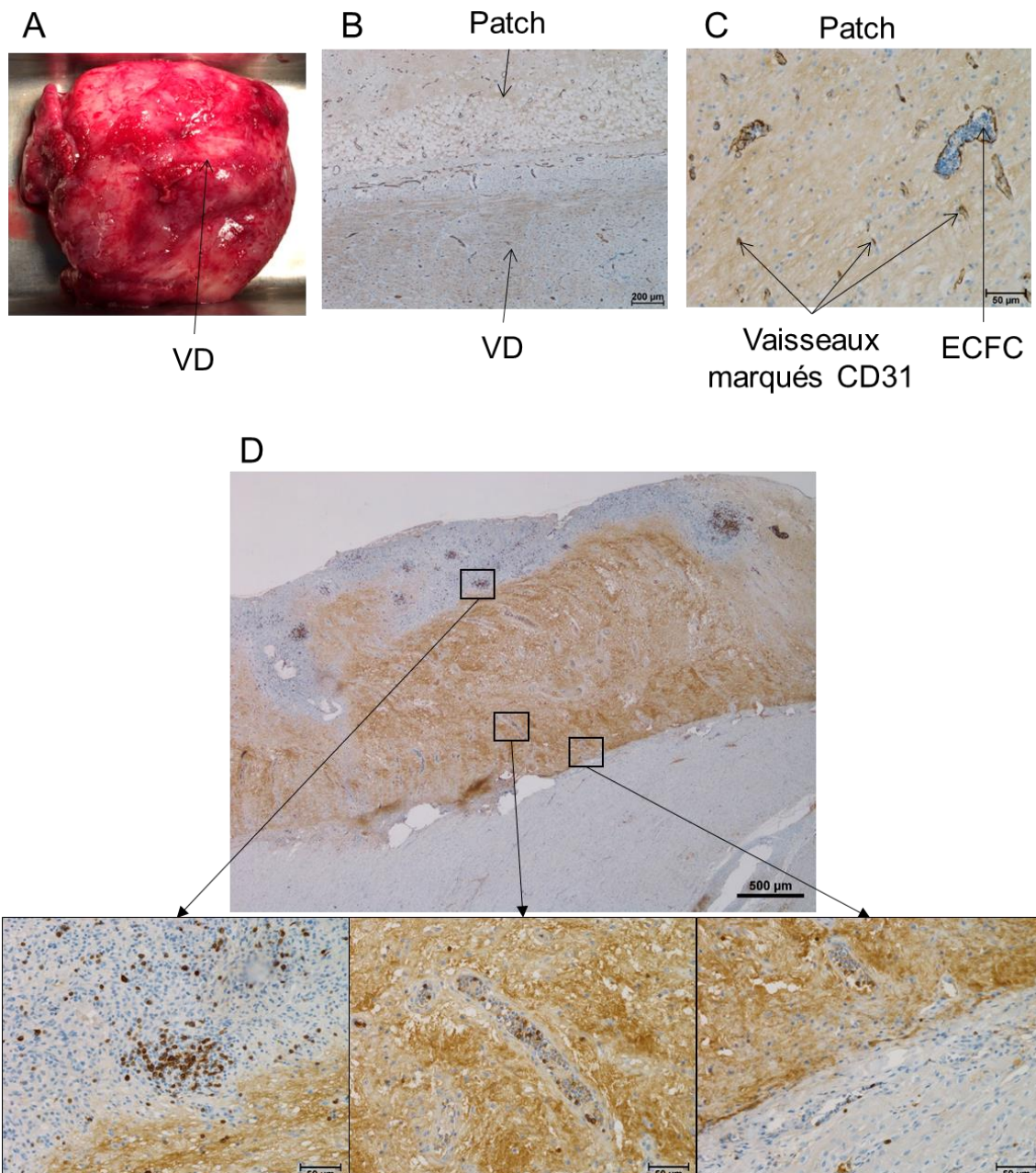


Figure 55 : Pose d'un patch ensemencé avec des ECFC sur le VD d'un porc pendant 7 jours. A : Cœur explanté 7 jours après la pose du patch. B : Coupe immunohistologique de VD et de patch, marquage CD31 (CD31 clone 1A10, 1:100, Diagnostics, Blagnac, France). C : Coupe immunohistologique du patch, marquage CD31. Cette photo révèle la présence de vaisseaux et d'ECFC dans le patch. D : Coupe immunohistologique de VD et de patch, marquage de l'infiltrat inflammatoire (CD3). Des cellules inflammatoires sont présentes dans le patch, dans le tissu qui l'a recouvert et dans le tissu à son contact. Tous les marquages ont été réalisés à l'aide du kit ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, California USA) et de l'automate Benchmark GX (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Toutes les photos ont été prises par le logiciel NIS-Element, Nikon.

Cette étude préliminaire a débuté par la pose d'un patch ensemencé avec des ECFC sur le VD d'un porc sain afin d'en étudier la faisabilité. A la vue des résultats peu concluants de cette première expérience il a été décidé (1) d'améliorer le marquage des ECFC, (2) d'augmenter la densité des ECFC dans le patch, (3) de laisser le patch plus longtemps au contact du tissu cardiaque (7 jours) et (4) de réaliser cette nouvelle expérience sur un porc HPPE. Cette seconde expérience n'a pas permis de démontrer la migration des ECFC vers le VD. De plus, avec cette seule expérience, nous ne pouvons pas conclure quant à un éventuel effet des ECFC sur le VD (augmentation de la densité capillaire, diminution de l'hypertrophie...). Les administrations par biomatériaux étant en plein essor, cette recherche nécessite donc d'être approfondie.

Discussion

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'effet de l'administration d'ECFC dans le VD d'un modèle porcin d'HPPE. Plusieurs voies d'administration ont été expérimentées, et la voie intracoronaire droite a donné les résultats les plus probants. En effet, une amélioration de l'hémodynamique cardiaque, une augmentation de la densité capillaire et une diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes ont été observées. L'injection intracardiaque n'a pas révélé de modification de l'hémodynamique cardiaque ni de la densité capillaire ou de l'hypertrophie. Cette dernière voie d'administration, plus localisée, n'aurait pas le même effet que la perfusion globale dans le VD par voie intracoronaire. Enfin l'administration des ECFC par patch a été initiée mais les expériences effectuées n'ont pas été suffisantes pour permettre d'évaluer l'éventuel effet des cellules. L'étude préliminaire *in vitro* de la culture de cardiomyocytes avec du milieu conditionné d'ECFC semble montrer que la concentration de sérum à laquelle sont cultivés les ECFC pour la production du milieu conditionné, joue un rôle sur l'hypertrophie des cardiomyocytes.

Suite à ces travaux de thèse, plusieurs points de discussion ont été soulevés. Il a été choisi d'organiser la discussion en différentes parties, chacune proposant une nouvelle hypothèse de travail pour améliorer ou poursuivre l'étude.

I. Utiliser un modèle porcin présentant une dysfonction cardiaque droite avec diminution de la densité capillaire

Chez le modèle porcin exploité ici, contrairement à ce qui a été démontré dans la littérature avec d'autres modèles animaux d'HTP, il n'y a pas de diminution de la densité capillaire du VD. Cette absence de baisse de la densité capillaire rend moins pertinente l'utilisation d'ECFC. En effet, les ECFC exercent leur activité d'angiogenèse principalement en condition d'ischémie du tissu. Etant donné que ce n'est pas le cas dans cette étude, il est possible que l'effet pro angiogénique des ECFC ne soit pas assez puissant pour qu'il induise un effet important sur la densité capillaire. L'absence de diminution de densité capillaire constitue la principale limite du modèle porcin d'HPPE utilisé ici.

Noly et al., qui ont étudié le même modèle porcin d'HPPE 14 semaines après l'établissement de la pathologie, ont observé une diminution de la densité capillaire, notamment par rapport au travail demandé au VD (Noly et al. 2017). A la vue de nos données et de celles de Noly et al., il semblerait que, 4 semaines après l'établissement de la pathologie, le VD soit adapté car l'angiogenèse paraît augmentée (cf notre étude). Au contraire, 14 semaines après, il est désadapté car il y a une raréfaction capillaire (cf étude de Noly et al.). Cependant, l'état de l'angiogenèse à lui seul ne permet pas de définir le VD comme adapté ou désadapté, d'autres critères sont requis (voir Tableau 3). Afin d'obtenir un modèle d'HTP qui reproduise la diminution de la densité capillaire du VD, nous pourrions reproduire les expériences avec des animaux utilisés plus tardivement après l'instauration de la pathologie, par exemple à 14 semaines comme dans l'étude de Noly et al.. Au sein de notre laboratoire, l'induction d'une défaillance cardiaque droite aigüe suite à la mise en place du modèle porcin d'HPPE a permis d'observer des lésions focales ischémiques dans le VD (Boulate et al. 2017). L'utilisation de ce modèle modifié pourrait constituer une alternative pour étudier l'effet des EFCF sur la densité capillaire du VD en HTP. Néanmoins, il s'agit ici d'un modèle de dysfonction cardiaque aigüe, ce qui est différent de la dysfonction cardiaque droite observée chez les patients HTP, fréquemment chronique. D'autres modèles gros animaux d'HTP pourraient aussi être utilisés, comme le modèle de ligature de la veine pulmonaire (Aguero et al. 2014) (Pereda et al. 2014) qui entraîne une HTP post-capillaire. Cependant, la densité capillaire n'a pas été évaluée dans ce modèle.

Dernièrement, Graham et al. remettent en cause le rôle clé de l'ischémie dans la dysfonction du VD en HTP. A l'aide d'une méthode de stéréologie, qui donne des informations quantitatives sur un tissu en 3D à partir de mesures réalisées sur du 2D, ils ont montré une corrélation entre l'augmentation du volume du VD et la longueur de ses vaisseaux dans un modèle de rat SuHx. Selon leurs résultats, il n'y aurait donc pas de raréfaction capillaire, comme décrit précédemment dans la littérature à l'aide d'immunomarquages, mais plutôt une prolifération des vaisseaux qui s'effectuerait en parallèle de l'augmentation du volume

du VD. Ils en concluent que le changement de métabolisme affecterait le VD en HTP plutôt que la raréfaction capillaire (Graham et al. 2018). Ce procédé a aussi été appliqué au VD de patients HTP et une corrélation entre la longueur vasculaire totale du VD et son volume a aussi été observée (Graham et al. 2017). Il y aurait donc une angiogenèse compensatrice dans le VD en HTP. Cependant, cette étude nécessite d'être reproduite car elle a pu être réalisée uniquement sur le VD de quatre patients. Ces résultats soulèvent tout de même des questions sur l'utilisation de nouvelles techniques, plus randomisées et moins biaisées que le classique immunomarquage, pour déterminer la densité capillaire et en déduire l'angiogenèse. Cette technique de stéréologie nécessiterait d'être appliquée à différents modèles animaux d'HTP et au modèle porcin d'HPPE utilisé dans cette thèse pour observer si les résultats sont reproductibles. Il est fort probable que dans notre modèle il existe aussi une relation entre la longueur des vaisseaux et l'hypertrophie du VD car avec la technique d'immunomarquage une augmentation de la densité capillaire est déjà constatée. Malheureusement, le volume global du VD n'a pu être estimé faute de donnée.

En définitive, la dysfonction cardiaque droite en HTP ne se résumant pas uniquement à l'ischémie, il serait intéressant de caractériser le VD des modèles animaux d'un point de vue métabolisme, inflammation, fibrose... et d'étudier l'effet des ECFC non pas uniquement sur la densité capillaire comme proposé ici, mais aussi sur d'autres mécanismes perturbés dans le VD en HTP.

II. Etudier l'effet d'un autre timing d'administration des cellules

Dans cette étude, quelle que soit la voie d'administration, les ECFC ont été délivrés une fois le modèle d'HPPE établi et stable. Il aurait pu être intéressant d'étudier l'effet de l'administration d'ECFC avant et pendant le développement de la pathologie. Ceci aurait peut-être entraîné un retard dans l'apparition des symptômes. Malheureusement, ce type de protocole semble difficilement applicable en clinique. Ici, le fait que les ECFC aient été administrés une fois la pathologie bien établie se rapproche de la réalité car l'HTP est

souvent diagnostiquée à un stade avancé et l'administration d'une thérapie cellulaire serait donc tardive par rapport à l'histoire de la maladie. Cependant, il serait peut être judicieux de réaliser plusieurs administrations, à intervalles de temps réguliers, une fois la maladie installée. En effet, il est fort probable que l'effet des cellules administrées soit transitoire et donc que des administrations régulières permettent de maintenir cet effet bénéfique (Tokita et al. 2016). Ceci est possible lors d'étude pré-clinique, mais il faut toujours garder en tête la faisabilité clinique : anesthésier régulièrement le patient pour lui administrer les cellules pourrait être compliqué à mettre en place. Une alternative à la délivrance régulière de cellules par voie invasive pourrait être l'utilisation d'un biomatériau permettant la prolifération cellulaire. Ainsi, les cellules seraient en mesure de libérer continuellement des facteurs favorisant le remodelage du tissu lésé.

III. Etudier plus en détail la voie d'administrations par patch pour améliorer la rétention cellulaire

Au cours de cette thèse, la voie d'administration par patch des ECFC n'a pas été approfondie, seule une étude préliminaire de faisabilité a pu être menée. Les expériences *in vitro* ont permis de montrer que les ECFC issus de sang périphérique de porc survivent et s'organisent en amas dans les patches de polysaccharides fournis par Dr Letourneur. Cette démonstration avait déjà été effectuée pour les ECFC issus de sang de cordon (Lavergne et al. 2012). Les poses de patches contenant les ECFC pendant 48h (porc sain) et une semaine (porc HPPE) n'ont pas démontré de migration des cellules vers le myocarde, et le nombre de porc (n=1) était trop faible pour déterminer si elles ont eu un effet sur le remodelage et l'hémodynamique du VD. Cette recherche nécessite donc d'être poursuivie. Il serait intéressant de la mener de la même manière que les études d'administration par voie intracoronaire et intracardiaque afin de pouvoir les comparer. De plus, les administrations intracoronaire et intracardiaque ayant indiqué le passage des ECFC par le VD mais pas leur rétention à long terme dans cet organe, l'administration par patch pourrait favoriser grandement la rétention cellulaire. L'injection intracoronaire de cellules CD34+ marquées au

2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (¹⁸F-FDG) à des patients ayant subi un infarctus du myocarde a révélé que seules 14% à 39% ont été retrouvées dans le myocarde, environ 1h après l'administration. Bien que ceci ait été réalisé chez seulement trois patients, ce résultat donne tout de même une idée de la rétention cellulaire dans le myocarde après une administration intracoronaire (Hofmann et al. 2005). Cette étude souligne l'importance de l'utilisation d'un procédé permettant une meilleure rétention des cellules administrées.

Dans cette étude, nous avons opté pour l'utilisation de patch de polysaccharides. Cependant, ce ne sont pas les seuls à être biocompatibles et à permettre la survie des ECFC. Un autre groupe a étudié l'administration de PEC, dans un modèle de rat d'infarctus du myocarde, via un hydrogel et a rapporté une meilleure vasculogénèse et prise de greffe des PEC en bordure de la zone infarctée en comparaison à l'injection intramyocardique (Atluri et al. 2014) (Gaffey et al. 2015).

IV. Utiliser d'autres méthodes pour suivre le devenir des ECFC après administration

Les ECFC ayant été retrouvés dans les poumons et la rate quatre semaines après leur administration intracoronaire et dans la rate après les injections intramyocardiques, nous aurions aimé suivre leur parcours de plus près pour savoir combien de temps ils ont séjourné dans le VD.

L'administration de cellules autologues a l'avantage de ne pas engendrer de réaction immunitaire mais elle rend plus difficile la détection des cellules administrées. En effet, au sein de la même espèce, l'administration de cellules issues d'un mâle à une femelle permet leur détection à l'aide d'anticorps spécifiques. Il en est de même pour l'administration inter espèce. Ici, afin d'identifier les cellules administrées, elles ont été transduites au préalable par des lentivirus afin qu'elles expriment la GFP. Ce marquage a permis de les localiser dans le VD 4h et 24h après leur administration par voie intracoronaire mais pas 4 semaines après. Dans le cas de l'administration intracardiaque, les cellules ont aussi été retrouvées

24h après leur administration à l'aide d'un marquage CD31 et une semaine après leur administration à l'aide d'un marquage GFP. En revanche les ECFC n'ont pas été retrouvés au-delà d'une semaine dans le VD.

Comme observé dans de nombreuses études, les cellules injectées au niveau du cœur se sont déplacées vers les poumons pour finir dans la rate (X. Zhao, Wu, et Huang 2010). Il aurait été intéressant de suivre leur devenir en temps réel afin de savoir à quel timing les ECFC se sont déplacés du cœur vers ces autres organes. Comme déjà mentionné ci-dessus, seuls 14% à 39% des cellules sont retrouvées dans le VD environ 1h après leur injection intracoronaire (Hofmann et al. 2005). De plus, la comparaison de la transplantation intracoronaire et intramyocardique de cellules CD34+ indique une meilleure rétention cellulaire dans le groupe intramyocardique ($19.2 \pm 4.8\%$ vs. $4.4 \pm 1.2\%$) après 18h (Vrtovec et al. 2013).

Dans un premier temps, nous avons pensé marquer les ECFC avec des nanoparticules de fer (SPIO : superparamagnetic iron oxyde) afin de suivre leur devenir de manière hebdomadaire à l'aide d'un IRM. Le suivi par IRM de l'administration intracoronaire de CSM-SPIO a déjà été réalisé chez le porc (Yang et al. 2011) (Huang et al. 2015). Cette technique permet un marquage relativement facile et la localisation des cellules après l'administration mais aussi à des temps tardifs. En revanche, l'observation d'un signal à ces temps avancés peut correspondre à des faux positifs car des SPIO peuvent être phagocytés par les macrophages. Malheureusement, nous n'avons pas au laboratoire la possibilité d'effectuer de telles expériences. Pour suivre le devenir des ECFC, nous aurions pu réaliser plusieurs administrations avec, à chaque temps, l'injection d'ECFC exprimant une protéine fluoresçant dans une couleur différente (le rouge : mcherry, le jaune : YFP, le vert : GFP, le cyan : CFP...). Ainsi, nous aurions pu déterminer le devenir des cellules à chaque timing d'administration et savoir dans quels organes/tissus les ECFC se greffent au bout d'une, 2, 3 et 4 semaines.

V. Amélioration de la thérapie cellulaire *per se*

Au cours de cette thèse, nous nous sommes servis d'ECFC isolés à partir de sang périphérique du porc. Ce produit de thérapie cellulaire est relativement simple car les ECFC n'ont pas été modifiés (à part la transduction GFP) et ont été administrés seuls.

Il aurait pu être intéressant d'évaluer l'effet de l'administration d'ECFC issus de sang de cordon. En effet, il a été démontré que ces derniers ont de meilleures capacités pro-angiogéniques que les ECFC issus de sang périphérique adulte (Au et al. 2008). En revanche ceci implique une administration hétérologue et donc le rejet immunogène qui peut s'ensuivre. Cependant, les ECFC de sang de cordon seraient moins immunogènes que ceux issus de sang adulte (Nuzzolo et al. 2014). Ces cellules sont donc attrayantes pour la thérapie cellulaire.

L'administration d'ECFC modifiés dans le but qu'ils sécrètent des vasodilatateurs pulmonaires, tels que la prostacycline et l'eNOS, aurait également pu être une piste d'étude. En effet, les ECFC ayant aussi été retrouvés dans les poumons suite à leur administration, en cas de sécrétion de ces vasodilatateurs, ils auraient été en mesure d'agir simultanément sur le cœur et sur les poumons. Ces PEC modifiés ont déjà été administrés chez des rats MCT par voie intraveineuse et ont induit une diminution de l'hypertrophie du VD et de sa pression systolique. Par ailleurs, une diminution de l'épaisseur de la paroi et de la prolifération des cellules dans les artères pulmonaires a été constatée (L. Zhou et al. 2013) (Y. D. Zhao et al. 2005).

Il a été démontré que cultiver des PEC en condition hypoxique préalablement à leur administration dans un membre ischémié favorise leur survie et leur capacité à induire l'angiogenèse (Akita et al. 2003) (Pei Zhou et al. 2017). Réaliser ce même type de pré-conditionnement par hypoxie avant leur administration dans le VD pourrait décupler les effets des PEC.

Les microvésicules de PEC ayant révélé leur capacité à diminuer l'hypertrophie des cardiomyocytes *in vitro* (Gu et al. 2014) et à augmenter l'angiogenèse *in vivo* (Chen et al. 2018), il pourrait être intéressant d'étudier l'impact de leur administration dans notre modèle porcin d'HPPE. Ceci permettrait de s'affranchir de la présence de cellules. Dans notre étude, l'effet observé semble être dû à la sécrétion de facteurs paracrines, il est donc probable que l'administration des microvésicules de PEC seules aurait eu la même action, bien que ceci reste à démontrer.

Enfin, il a été mis en évidence que la co-injection de PEC et de CSM a permis la formation d'un réseau vasculaire plus développé (Melero-Martin et al. 2008) et une amélioration plus importante de la fonction cardiaque (K. Sun et al. 2016) qu'avec les CSM ou les PEC seuls. Par conséquent, il peut être intéressant d'administrer les PEC en combinaison avec les CSM dans un modèle d'HTP afin de constater si les effets observés sont décuplés.

VI. Poursuivre la culture *in vitro* cardiomyocytes / ECFC

Suite à l'injection intracoronaire d'ECFC, nous avons observé une diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes et, comme les ECFC n'ont pas été retrouvés dans le VD 4 semaines plus tard, nous en avons conclu à un effet paracrine. Nous avons donc émis l'hypothèse que la réversion de l'hypertrophie observée *in vivo* suite à l'administration d'ECFC passait par l'action paracrine de ces cellules. C'est pourquoi, dans l'objectif de réaliser une étude préliminaire, notre choix s'est porté sur la culture de cardiomyocytes seuls avec du milieu conditionné d'ECFC plutôt que sur la co-culture ECFC/cardiomyocytes. Nous avons observé que l'application de milieu conditionné d'ECFC ne permet pas de réverser l'hypertrophie des cardiomyocytes dérivés d'iPS *in vitro* dans les conditions étudiées ici. Ainsi, suite à cette expérience de culture très préliminaire, il semblerait que notre hypothèse soit invalidée. Il est certain que l'expérience *in vitro* ne reproduit pas l'ensemble des conditions présentes *in vivo* dans le VD défaillant (ischémie, altération du métabolisme, fibrose, inflammation...). Ceci pourrait expliquer pourquoi les facteurs sécrétés par les ECFC

n'ont pas le même effet *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, nous avons fait en sorte d'induire l'hypertrophie des cardiomyocytes par la voie de l'endothéline-1, dont l'expression est retrouvée augmentée dans le VD de patients et de rats atteints d'HTP (Nagendran et al. 2013), laissant penser que l'hypertrophie du VD en HTP est liée à la régulation à la hausse de cette protéine.

A ma connaissance, seules trois études ont évalué l'effet du milieu conditionné de PEC sur les cardiomyocytes. La première a incubé des cardiomyocytes de rats néonataux pendant 48h avec du milieu conditionné de PEC humains ce qui a conduit à une augmentation de la surface des cardiomyocytes. Il est à noter que dans cette expérience les cardiomyocytes n'avaient pas été hypertrophiés au préalable. Cette étude reproduit donc moins bien ce qui est observé *in vivo* lors d'une dysfonction cardiaque. L'ajout d'anticorps neutralisants TGF β 1 dans le milieu conditionné a montré une diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes (Doyle et al. 2008). Leurs résultats suggèrent que les PEC induisent l'hypertrophie des cardiomyocytes principalement via la sécrétion de TGF β 1. Cette étude a obtenu des résultats similaires aux nôtres.

Hynes et al. quant à eux, ont administré du milieu conditionné de PEC par voie intracoronaire dans le VG d'un modèle porcin d'infarctus du myocarde. La surface des cardiomyocytes a été retrouvée augmentée. En revanche, l'administration de milieu conditionné de PEC contenant un anticorps neutralisant IGF1 a entraîné une diminution de cette hypertrophie (Hynes et al. 2013). D'après ces résultats, il semblerait que l'effet pro-hypertrophique des PEC passe par l'action d'IGF1. Dans cette étude, Hynes et al. observent une augmentation de l'hypertrophie du VG suite à l'administration intracoronaire de PEC contrairement à ce que nous avons observé dans le VD de porcs HPPE (Loisel, Provost, Guihaire, et al. 2018). Cependant, il paraît difficile de comparer des résultats obtenus sur le VG d'un modèle d'infarctus du myocarde à ceux du VD d'un modèle d'HTP. En effet, les mécanismes impliqués dans ces deux pathologies sont différents.

L'étude de Gu et al., a induit l'hypertrophie d'une lignée de cardiomyocytes (H9c2) à l'aide d'angiotensine 2 et évalué l'effet des microvésicules sécrétés par les PEC sur cette hypertrophie (Gu et al. 2014). L'ajout des microvésicules, récupérées par ultracentrifugation du milieu conditionné, permet d'augmenter la survie et de diminuer la surface des cardiomyocytes. D'après leurs résultats, cette action est possible grâce à la présence des ARN que les microvésicules transportent. Cette étude suggère que les PEC ont la capacité de réverser le remodelage des cardiomyocytes. Dans notre étude, nous avons utilisé du sérum sans microvésicules afin d'évaluer spécifiquement l'effet des microvésicules produites par les ECFC. Cependant, nous n'avons pas étudié exclusivement le rôle des microvésicules des PEC comme Gu et al., or il est probable que ce soient ces facteurs qui jouent le rôle principal dans la réversion de l'hypertrophie. Ces dernières années, des recherches sur les microvésicules ont démontré leur rôle dans de nombreux mécanismes, il serait intéressant d'étudier, comme Gu et al., l'effet des microvésicules d'ECFC sur l'hypertrophie des cardiomyocytes.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer la différence de résultats entre nos expériences *in vivo* et *in vitro* est que la réversion de l'hypertrophie observée *in vivo* ne soit pas le résultat d'une action paracrine des ECFC mais d'un contact direct entre ces cellules et les cardiomyocytes. Pour vérifier cette nouvelle hypothèse, il serait important de réaliser une co-culture directe d'ECFC et de cardiomyocytes, avec différents ratios des 2 types cellulaires. Pour perfectionner l'expérience, les ECFC pourraient être préalablement mis en condition d'hypoxie pour mimer le stress qu'ils subissent lors d'une dysfonction cardiaque.

Quelques études ont déjà réalisé la co-culture de PEC et de cardiomyocytes mais aucune n'a analysé l'effet de cette co-culture sur l'hypertrophie des cardiomyocytes. Les premières ont démontré que les PEC cultivés avec des cardiomyocytes étaient capables de se transdifférencier en cardiomyocytes (Condorelli et al. 2001) (Badorff et al. 2003) (Koyanagi et al. 2005) à l'aide de communication intercellulaire à jonction lacunaire. Avec l'évolution des techniques, il s'est avéré qu'il ne s'agissait pas de jonctions entre les cellules mais

d'artéfacts et les analyses de transfert de marqueurs fluorescents des cardiomyocytes vers les PEC ont montré que les cellules receveuses étaient nécrotiques (Gruh et al. 2006). De nombreuses mises au point seront donc requises pour déterminer les conditions de co-culture optimales étant donné qu'il manque d'exemple dans la littérature.

Enfin, il est aussi probable que la modification de l'hypertrophie soit une conséquence indirecte de l'augmentation de la vascularisation par les ECFC injectées (vascularisation induite par voie paracrine ou par contact cellule/cellule). Dans cette hypothèse, la réversion de l'hypertrophie serait une réponse indirecte à l'injection des ECFC et liée à la modification de la densité capillaire.

Cependant, il faut garder à l'esprit que l'expérience *in vitro* réalisée ici est très préliminaire et nécessite d'être reproduite afin d'être certain des hypothèses que nous avançons. Nous pouvons donc difficilement conclure avec cette seule expérience.

Conclusion et Perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons démontré la faisabilité de l'administration d'ECFC autologues par voies intracoronaire et intracardiaque. D'après les résultats, la voie intracoronaire serait la plus efficace car elle permet une amélioration de l'hémodynamique cardiaque, une augmentation de la densité capillaire et une diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes. Tous ces effets bénéfiques ne sont pas retrouvés lors de l'administration intracardiaque. La localisation des cellules en « cluster » dans le tissu cardiaque suite aux injections dans le VD pourrait expliquer ces résultats. En effet, l'administration intracoronaire a permis une répartition plus diffuse dans le myocarde, or la dysfonction cardiaque droite n'est pas localisée à des points précis du VD. Par conséquent, c'est peut être cette répartition diffuse des cellules qui a permis leur action dans tout le VD et donc engendré une action plus importante. Nous avons supposé que les effets observés suite à l'administration de cellules étaient dus à la sécrétion de facteurs paracrines plutôt qu'à leur action directe au niveau du tissu myocardique. Pour valider cette hypothèse, nous avons choisi d'effectuer une expérience *in vitro* qui consistait à mettre des cardiomyocytes hypertrophiés en présence de milieu conditionné d'ECFC. Les premiers résultats obtenus ne confirment pas notre hypothèse. Cependant, ils sont très préliminaires. L'administration des cellules par patch a été initiée mais nécessite encore des mises au point. Avec nos données préliminaires, nous ne pouvons pas encore conclure quant à l'efficacité de cette voie d'administration. Il paraît important de souligner que le plan expérimental qui a été suivi avait pour objectif une application en clinique ultérieure. Les ECFC seraient isolés à partir du sang périphérique du patient au moment du diagnostic de l'HTP et pourraient être administrés au cours d'une intervention. Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser une thérapie cellulaire pour viser une nouvelle cible : le VD dans le cas de l'HTP. Il s'agit d'un projet innovant car, dans le domaine des pathologies cardiaques, les études de thérapies cellulaires sont focalisées sur le traitement du VG. Nous avons démontré des effets bénéfiques de l'administration d'ECFC dans le VD dans un modèle porcin d'HTP. Ainsi, l'utilisation d'une thérapie cellulaire ciblant le VD en HTP est novatrice et semble prometteuse. Cependant, les études précliniques présentées ici nécessitent encore d'être

optimisées avant d'envisager un passage à la phase clinique. La poursuite de ses recherches paraît essentielle afin de prolonger la survie des patients atteints d'HTP en retardant l'apparition d'une dysfonction cardiaque droite. Suite aux résultats obtenus au cours des études menées pendant cette thèse, deux principaux axes de recherche, à mener dans un futur proche, se dégagent :

1/ Optimisation de la voie d'administration : Ces dernières années, l'administration de produits de thérapie cellulaire associés via des biomatériaux s'est considérablement développée et apparaît comme l'avenir de la thérapie cellulaire. En effet, après plusieurs études précliniques (Hamdi et al. 2011) et cliniques (Vrtovec et al. 2013) menées sur le VG, cette voie d'administration semble être la plus appropriée en termes de bénéfice/risque pour le patient. De plus, la plupart des biomatériaux étant modulables à façon, il serait possible de les concevoir afin qu'ils apportent des améliorations fonctionnelles à l'ensemble du VD remodelé.

2/ Optimisation du produit de thérapie cellulaire : Il a été montré au sein du laboratoire que les ECFC de sang périphérique adulte ont des capacités angiogéniques moindres par rapport aux ECFC issus de sang de cordon (Ferratge et al. 2017). De plus, les dernières recherches sur les ECFC de sang de cordon les décrivent comme ayant un meilleur potentiel angiogénique (Au et al. 2008) et engendrant une réponse immunitaire moindre en comparaison aux ECFC de sang adulte (Nuzzolo et al. 2014). Bien que nous n'ayons pas observé d'altération des ECFC après la modélisation de la pathologie, certaines études ayant analysé l'efficacité des progéniteurs endothéliaux issus de patients HTP concluent que leur fonction serait atteinte (Diller et al. 2008) (Junhui et al. 2008b) (Smadja et al. 2010). Nos données récentes indiquent que les ECFCs obtenus à partir de sang de cordon ombilical, sont beaucoup plus actives que les ECFCs issus de sang périphérique adulte, et de plus, elles sont immuno-tolérées (données en cours de publication). Ces cellules thérapeutiques allogéniques pourraient donc être préparées à l'avance et stockées,

de manière à être immédiatement disponibles pour les patients. Cette voie de thérapie cellulaire prometteuse devra bien sûr être soigneusement validée par des tests pré-cliniques.

Dans un futur proche, il est primordial d'approfondir les recherches afin d'optimiser l'utilisation de biomatériaux, composés de matériaux biocompatibles couramment utilisés en clinique, associés à des ECFC isolés à partir des sangs de cordons déjà stockés dans les banques. La thérapie cellulaire ainsi mise au point pourra alors bénéficier à une large proportion des patients atteints d'HTP afin de ralentir la progression de leur insuffisance cardiaque droite.

Dans un deuxième temps, les recherches devront se concentrer sur l'utilisation de vésicules extracellulaires (VE), comprenant, entre autres, les exosomes. En effet, aujourd'hui, il est de plus en plus reconnu que les cellules souches transplantées ne s'intègrent que transitoirement dans le tissu cardiaque même si leurs effets peuvent perdurer dans le temps. Par conséquent, l'hypothèse d'une action paracrine des cellules administrées a été privilégiée : les cellules greffées secrèteraient plusieurs facteurs qui activeraient les voies de réparation endogènes. Les VE contiennent ces facteurs et ont la capacité de les transférer à la cellule avec laquelle ils fusionnent. Elles peuvent ainsi moduler en profondeur l'activité des principales voies de signalisation et donc influencer la fonction de la cellule. De ce fait, les études s'orientent de plus en plus vers des thérapies acellulaires qui consistent en l'administration seule de VE dérivées des cellules d'intérêt (Wu, Hu, et Wang 2018). Le processus de production de ces produits biologiques serait alors plus proche de celui d'un composé pharmaceutique, ce qui pourrait simplifier les processus de fabrication et de réglementation et faciliter ainsi une utilisation clinique étendue (Philippe Menasché 2018b) (Philippe Menasché 2016). D'après les premières études sur le sujet il semblerait que l'administration de VE dérivées de cellules souches soit plus sûre et plus bénéfique que l'administration des cellules souches elles-mêmes (Yuan et al. 2018).

Aujourd'hui, il est de plus en plus proposé d'utiliser des thérapies personnalisées, notamment dans le cas du cancer avec les immunothérapies. Avec le développement de ce type de médecine personnalisée, il est possible qu'un jour chacun puisse avoir à disposition des cellules souches-médicaments qui cibleraient de manière spécifique les différentes pathologies contractées au cours de la vie. Actuellement, même si les avancées technologiques ne permettent pas aux thérapies cellulaires de dépasser le stade des essais cliniques, des banques de sang de cordon et d'iPS se mettent en place, avec l'espoir qu'un jour, elles permettent de produire à façon et à la demande des cellules pour traiter différents types de pathologies. Il faut savoir qu'à l'heure actuelle, il n'est pas possible de conserver le sang de cordon et d'en extraire les cellules progénitrices pour de les utiliser à des fins autologues. Concernant l'utilisation de cellules dérivées d'iPS, un seul essai clinique avec des iPS autologues a été initié mais a dû être arrêté car des aberrations génétiques ont été identifiées. L'essai a maintenant repris avec des iPS allogéniques (Mandai, Kurimoto, et Takahashi 2017). Les investigateurs de cette étude sont en train de mettre en place une banque d'iPS allogéniques et l'idée est de pouvoir un jour se servir de cette banque comme d'une pharmacie. L'inconvénient majeur de l'utilisation de cellules allogéniques en thérapies est leur élimination par le système immunitaire du patient receveur. Le risque de ce rejet immunitaire pourrait toutefois être atténué par la création de lignées cellulaires homozygotes pour les phénotypes HLA (Human Leukocyte Antigen) courants ce qui permettrait d'administrer uniquement les iPS dont la signature immunitaire correspondrait à celle du patient. De cette manière, le nombre de receveurs potentiels pourrait être augmenté.

La perspective de ce projet est de développer une thérapie cellulaire afin de soutenir le VD défaillant chez des patients atteints d'HTP et ainsi prolonger leur durée de vie. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que des cellules peuvent avoir un effet bénéfique sur le VD mais délétère sur l'arbre vasculaire pulmonaire. De plus, traiter le VD n'est pas pertinent si le système circulatoire est toujours pathologique. Il convient donc d'associer cette thérapie à des traitements ciblant le système vasculaire pulmonaire afin d'améliorer significativement

la survie des patients. Il peut aussi être approprié d'appliquer une thérapie qui cible à la fois le VD et la circulation pulmonaire (Stenmark et Graham 2018).

Pour conclure, l'administration d'ECFC paraît être une thérapie prometteuse pour soutenir la fonction du VD en HTP. J'espère que ce travail de thèse lancera le développement de nouvelles thérapies cellulaires ayant pour objectif de palier à la dysfonction du VD dans cette pathologie rare et grave qu'est l'HTP.

Annexes

Annexe 1 : Revue « Stem cell therapy targeting the right ventricle in pulmonary arterial hypertension : is it a potential avenue of therapy? » Loisel et al.

Stem cell therapy targeting the right ventricle in pulmonary arterial hypertension: is it a potential avenue of therapy?

Fanny Loisel^{1,2,*}, Bastien Provost^{1,*}, François Haddad³, Julien Guihaire¹, Myriam Amsallem¹, Bojan Vrtovec⁴, Elie Fadel^{1,5}, Georges Uzan² and Olaf Mercier^{1,5}

¹Research and Innovation Unit, Inserm UMR-S 999, Marie Lannelongue Hospital, Université Paris Sud, Paris-Saclay University, Le Plessis Robinson, France; ²Inserm I197 Research Unit, Université Paris Sud, Paris-Saclay University, Villejuif, France; ³Cardiovascular Medicine, Stanford Hospital, Stanford University, CA, USA; ⁴Department of Cardiology, Advanced Heart Failure and Transplantation Center, University Medical Center Ljubljana, Ljubljana, Slovenia; ⁵Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital, Université Paris Sud, Paris-Saclay University, Le Plessis Robinson, France

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an incurable disease characterized by an increase in pulmonary arterial pressure due to pathological changes to the pulmonary vascular bed. As a result, the right ventricle (RV) is subject to an increased afterload and undergoes multiple changes, including a decrease in capillary density. All of these dysfunctions lead to RV failure. A number of studies have shown that RV function is one of the main prognostic factors for PAH patients. Many stem cell therapies targeting the left ventricle are currently undergoing development. The promising results observed in animal models have led to clinical trials that have shown an improvement of cardiac function. In contrast to left heart disease, stem cell therapy applied to the RV has remained poorly studied, even though it too may provide a therapeutic benefit. In this review, we discuss stem cell therapy as a treatment for RV failure in PAH. We provide an overview of the results of preclinical and clinical studies for RV cell therapies. Although a large number of studies have targeted the pulmonary circulation rather than the RV directly, there are nonetheless encouraging results in the literature that indicate that cell therapies may have a direct beneficial effect on RV function. This cell therapy strategy may therefore hold great promise and warrants further studies in PAH patients.

Keywords

progenitor cells, stem cells, congenital heart defect, right ventricle failure, pulmonary arterial hypertension

Date received: 16 November 2017; accepted: 9 January 2018

Pulmonary Circulation 2018; 8(2) 1–17

DOI: 10.1177/2045893218755979

Introduction

Despite significant advances in terms of its medical management, pulmonary arterial hypertension (PAH) remains an incurable condition that requires a lung or a heart and lung transplantation when refractory right heart failure occurs. It is well-known that right ventricular function is the main prognostic risk factor in PAH.¹ Although stem cell therapies targeting the left ventricle (LV) are proving to be promising therapies in animal models, the results of recent multicenter trials with humans have been mixed.² The promising results observed in animal models led to clinical trials in adults that have shown improvements in regard to LV function, infarct size, and cardiac remodeling.^{3,4} Hence, in light of the increased relevance of the pathophysiology of

right ventricle (RV) failure, one can hope that the next decade will see new therapeutics that specifically target the RV.

In contrast to left heart disease, stem cell therapy applied to the RV has not been studied much, despite indications that it may be a viable therapeutic option. This review focuses on stem cell therapy as a treatment for RV failure in PAH.

*Equal contributors.

Corresponding author:

Olaf Mercier, Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Research and Innovation Unit, Marie Lannelongue Hospital, 133 Avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis Robinson, France.
Email: o.mercier@cml.fr



Creative Commons CC-BY: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits any use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

© The Author(s) 2018.
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
journals.sagepub.com/home/pul



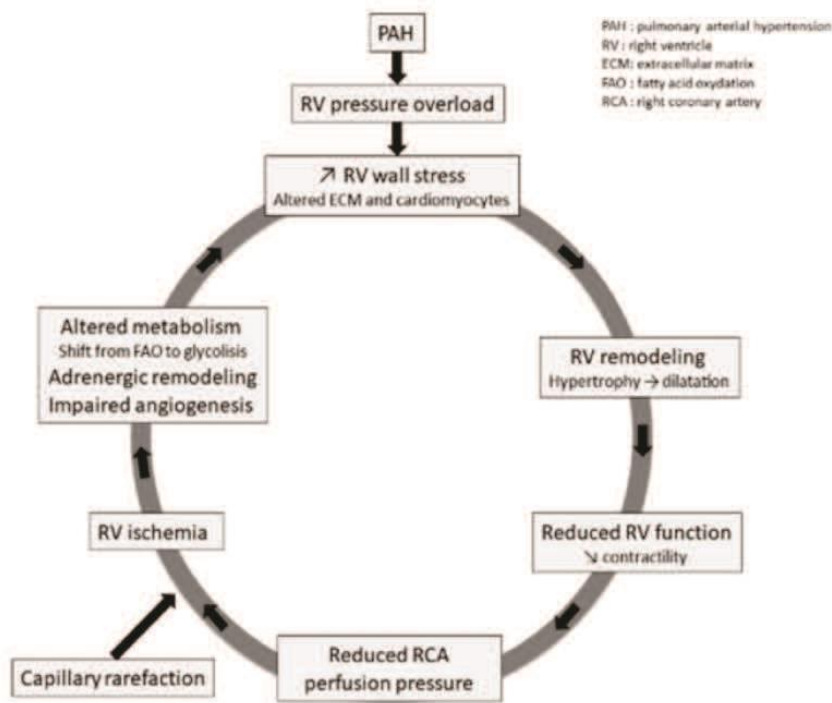


Fig. 1. Cycle of right ventricle failure in pulmonary hypertension.

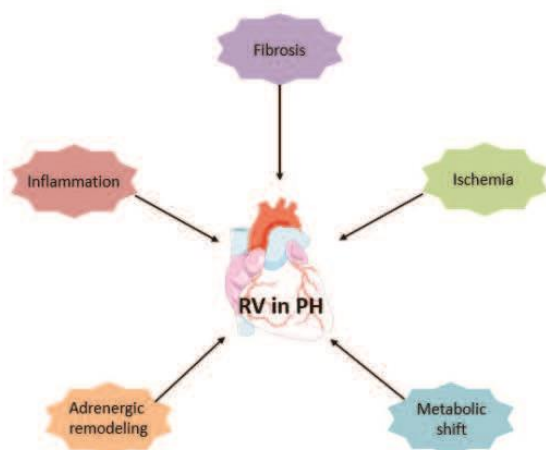


Fig. 2. Right ventricle remodeling in pulmonary hypertension.

Pathophysiology of right ventricle failure

PAH is defined by the World Health Organization as precapillary pulmonary hypertension with a mean pulmonary arterial pressure (mPAP) ≥ 25 mmHg.⁵ PAH affects an estimated 15–60 individuals out of a million.^{5,6} It is characterized by a progressive increase in pulmonary vascular resistance (PVR) and vascular remodeling, with ensuing right heart failure and early death when it goes untreated.⁷ RV function is the main prognostic factor in PAH.⁸ Pathobiological changes in the pulmonary vascular bed are characterized by intimal hypertrophy, adventitial

remodeling, smooth muscle hypertrophy, in situ vasoconstriction, and thrombosis. All of these changes increase PAP, which in turn induces a rise in pulmonary arterial resistance. As a result, the RV is subject to an increased afterload and it has to pump blood more intensely to meet the oxygen demands of the body.⁹ RV remodeling changes from an adaptive to a maladaptive phenotype as the disease progresses. The RV first undergoes an increase in wall thickness and contractility so as to maintain a normal cardiac output and ventriculo-arterial (VA) coupling. This compensatory state is called adaptive RV remodeling. As the PAH deteriorates, the RV remodeling shifts from an adaptive to a maladaptive state that includes RV dilatation, decreased contractility, and VA uncoupling (Fig. 1).^{10,11} Ultimately, patients present with end-stage RV failure that leads to death. Numerous studies have shown that survival correlates with RV function.¹²

The shift from an adaptive to a maladaptive state is not well understood at present. RV remodeling depends on many factors including neurohormonal activation, myocardial metabolism, myocardial perfusion, genetic factors, inflammation, and alteration of the extra-cellular matrix (ECM) (Fig. 2).¹¹ Unlike adaptive remodeling, maladaptive RV remodeling is characterized by dilatation, decreased cardiac output, VA uncoupling, and a high mortality rate. At the cellular level, maladaptive RV remodeling is associated with decreased angiogenesis, increased fibrosis, metabolic changes, and dysregulation of the autonomic nervous system.¹³ Although it is a poorly understood process, it appears that the transition from adaptive to maladaptive RV remodeling is a continuum that ultimately leads to

end-stage heart failure. A decrease in ventricular capillary density has been found in various PAH animal models and in humans at the stage of maladaptive remodeling or heart failure.^{14,15} A degree of RV ischemia in patients suffering from PAH was first shown by Gomez et al. in 2001 using myocardial scintigraphy, and it correlated with the hemodynamic severity and the RV end-diastolic pressure.¹⁶ Using the monocrotaline (MCT) rat model of PAH, Sutendra et al. also found that the transition from adaptive to maladaptive RV was associated with a decrease in VEGF, myocardial SDF1 levels, and RV capillary density.¹⁷ Pathological examination of the RV of PAH patients has confirmed these findings, revealing a decrease in capillary density compared to a control group.¹⁵

Although RV failure is the main cause of mortality in PAH, it has been shown to have a tremendous capacity to reverse the remodeling when the afterload is removed, as seen following pulmonary transplantation.¹⁸ Plasticity is one of the key differences in the pathophysiology of RV and LV failure. Several studies have highlighted the role of myocardial ischemia as one of the leading causes of RV failure in PAH patients.¹⁷ Even though the mechanisms leading to decreased RV perfusion in PAH have not been entirely elucidated, we believe that targeting angiogenesis in the RV myocardium appears to be a promising approach to improve its function. The use of stem cells as therapeutic agents could, hence, represent a new treatment option for PAH. Thus, while there are no stem cell therapies at present that target the RV in PAH, studies in this regard that are focused on the RV in PAH are clearly warranted.

Stem cells for right ventricle therapy

Given the nature of the pathophysiology of PAH induced by RV failure, the stem cells should ideally be readily

available, immuno-compatible, proangiogenic, and anti-inflammatory. Of note, several cell types have already been evaluated for PAH treatment targeting the pulmonary circulation, although the RV has so far not been directly targeted.

Mononuclear stem cells

Umbilical cord blood (UCB) is a readily available source of stem cells, such as mononuclear stem cells (MNC). MNC can readily be isolated from UCB by Ficoll density gradient centrifugation.¹⁹ UCB hence represents a promising source of cells for proangiogenic therapies. An MNC fraction isolated from UCB has been shown to exhibit pericyte-like function: they acted as proangiogenic mural cells by supporting endothelial progenitor cell (see below) network formation *in vitro*.²⁰ These are the two vascular cell types required for stable microvessel formation.²¹ UCB-MNC also have antifibrotic and proangiogenic potential *in vivo*.²² Given that MNC comprise many different cell types (Fig. 3), determining which cell type is responsible for a potential beneficial effect is a challenge. UCB is currently the most prevalent available source for stem cells.²³ However, it is an allogenic source (unless the cells are derived from matched samples harvested at the time that the individual was born), which is a significant limitation for its use.

Most studies of MNC to date have used UCB-derived MNC (UCB-MNC). Cantero Peral et al. have demonstrated that RV epicardial injection of autologous UCB-MNC in piglets is safe and feasible. Indeed, there were no significant cardiac injuries caused by the injection, as measured by cardiac troponin T levels and the absence of arrhythmias.²⁴ In a chronic RV volume overload model, Yerebakan et al. showed that epicardial UCB-MNC injection improved RV

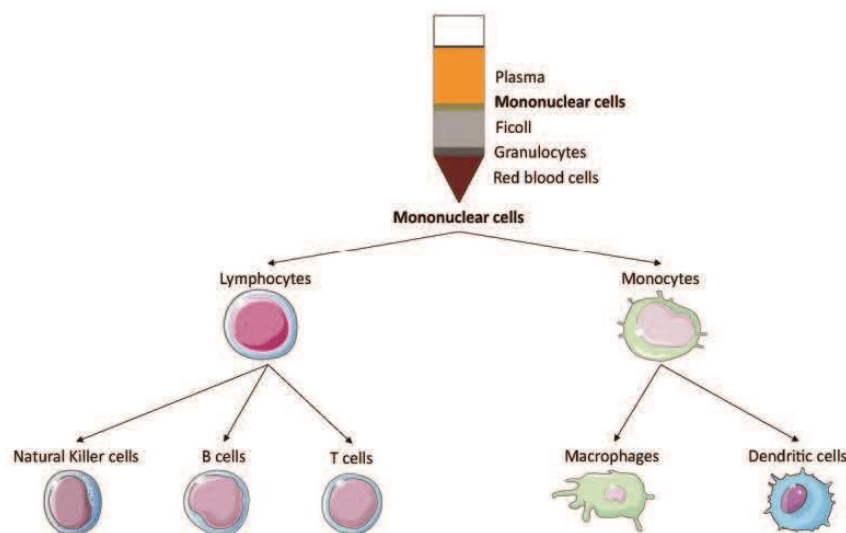


Fig. 3. Mononuclear cell isolation allows the recovery of different cell types such as natural killers, B cells, T cells, macrophages, and dendritic cells.

diastolic function and increased capillary density within the area of the cell injection.²⁵ Moreover, in a pulmonary artery banding murine model, UCB-MNC injections led to improvement in RV structure and function, reduction in RV fibrosis, and an increase in angiogenesis biomarkers.²² Lastly, in an ovine model of RV training, epicardial UCB-MNC injections improved diastolic and systolic RV functions.²⁶

Mesenchymal stromal cells

Mesenchymal stromal cells (MSC) can be isolated, for example, from bone marrow (BM), umbilical cord Wharton's jelly, placenta, adipose tissue, and muscle (Fig. 4). These multipotent stromal cells can differentiate into a variety of cell types including osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. They express cell surface markers such as CD73, CD90, and CD105 and they lack surface expression of CD31, CD14, CD24, and CD45.²⁷ MSC have the ability to migrate to injured lung tissue where they secrete angiogenic (VEGF), anti-apoptotic (Bcl-2), and anti-inflammatory factors (IFN, IL-10, VEGF, and HGF).²⁸ In normal or hypoxic conditions, they secrete factors that stimulate endothelial cell chemotaxis and adhesion.²⁹ The immune tolerance of MSC is an important feature that makes them very suitable for clinical use.³⁰ Given their proangiogenic and cytoprotective effects due to the release of paracrine factors, MSC are attractive candidates for RV cell therapy in PAH. They may in fact increase capillary density and protect cardiomyocytes from hypertrophy and fibrosis. Last but not least, their immunomodulatory properties make them particularly attractive for stem cell therapy.³¹ However, the properties of MSC as well as the effectiveness of their isolation can vary depending on the tissue of origin.³²

It has been demonstrated that intravenous injection of BM and UCB-derived MSC improved right ventricular hypertrophy (RVH) and right ventricular ejection fraction (RVEF) of MCT-induced PAH rats.^{33,34} A decrease in the RV to LV+septal weight ratio after MSC injection was observed in a model of overflow-induced PAH as well.³⁵ The use of human embryonic stem cell-derived (hESC) MSC yielded better results compared to adult BM-MSC in

terms of the improvement of RVH and right ventricular systolic pressure (RVSP) of intravenously injected MCT-induced PAH rats.³⁶ Lastly, similar results have been reported for intratracheal administration.³⁷

Kanki-Horimoto et al. intravenously administered MSC overexpressing eNOS in MCT-induced PAH rats. They found that the RVSP and RV/body weight were lower in the MSC/eNOS group than in the MSC control group.³⁸ Another study used MSC expressing heme oxygenase-1 (HO-1), which is known to have protective function and to restore homeostasis in many diseases. Intravenous injection of MSC expressing HO-1 in a chronic hypoxia-induced PAH model resulted in normal RVSP and a significant reduction of RVH.³⁹ Kang et al. intravenously injected MSC primed with a factor that sensitized the stem cells to a chemotactic gradient in MCT-induced PAH rats. Their study revealed that primed MSC were better than human umbilical cord blood-derived non-primed MSC.⁴⁰

It should be pointed out that we have only reported results regarding the RV. All of the studies were designed to treat pulmonary circulation, and they showed an improvement in lung injury, thus suggesting that MSC may be a promising therapeutic option for PAH. However, whether the improvement of RV function was due to a direct effect of the cell therapy or the decrease in pulmonary resistance remains an unanswered question. The RV has never been directly targeted by intravenous MSC administration, except in the setting of congenital heart defect (CHD) models. Indeed, intracoronary administration of MSC in a CHD model showed stabilization of right ventricular distolic pressure (RVDP) and RVSP after the treatment.⁴¹

Furthermore, as MSC have beneficial effects on endothelial progenitor cells (EPC), their co-injection allowed for the formation of a more developed vascular network than with either MSC or EPC alone.⁴² As a result, it may be interesting to administrate MSC in combination with EPC in a PAH or CHD model to see whether this results in a greater benefit.

Endothelial progenitor cells

Endothelial progenitor cells (EPC), first described by Asahara et al. in 1997, are a circulating, BM-derived cell population. Asahara et al. found that mononuclear blood

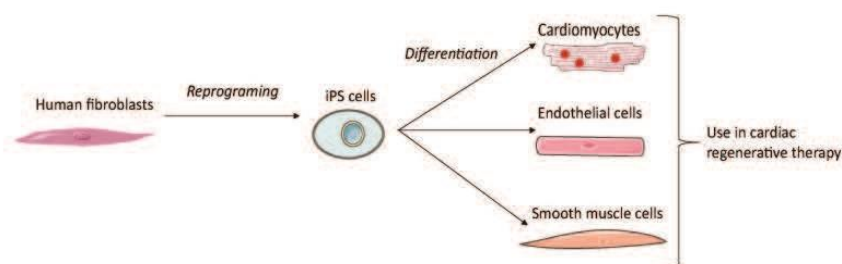


Fig. 4. Mesenchymal stem cell isolation. Mesenchymal stem cell can be isolated from various tissues such as bone marrow, muscle, placenta, umbilical cord, or adipose tissue.

cells isolated from human peripheral blood expressing CD34+ or vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) could differentiate into endothelial cells.⁴³ EPC can be isolated from peripheral blood, UCB or from BM. One method for identifying EPC is based on the expression of various protein markers on the cell surface. There is no single specific marker for identifying EPC. The

first markers used to identify EPC, as defined by Asahara, were CD34 and VEGFR-2. Currently, in order to be defined as EPC, the cells must express a set of distinguishing markers, while they also share common markers with hematopoietic stem cells (HSC) and circulating endothelial cells (CEC) (Table 1). This is why other characteristics are required to define cells as EPC, such as specific phenotypic and functional properties including the formation of tubular structures⁴⁴ and their ability to migrate in response to stimuli (e.g. VEGF, SDF-1).⁴⁵

EPC can be divided into three subpopulations: colony forming unit Hill (CFU-Hill); early outgrowth; and late outgrowth EPC (Table 2 and Fig. 5). All of these are inducers of angiogenesis, either as result of their ability to repair damaged vessels and to generate of neo-vessels or by their release of paracrine factors that stimulate vascular repair and regeneration.⁴⁶ EPC subpopulations exhibit differences in their capacity to induce angiogenesis.⁴⁷⁻⁴⁹ Hence, there is a need for a clear definition of the subpopulation that is used

Table 1. Shared markers between HSC, CEC, and EPC.

Circulating cells	Phenotype
Hematopoietic stem cells (HSC)	CD34+, CD45+, CD133+, KDR+
Circulating endothelial cells (CEC)	CD34+, CD45-, CD133-, KDR+, CD146+, CD31+, vWf+
Endothelial progenitor cells (EPC)	CD34+, CD45-, CD133+, KDR+, CD14-, CD146+

Table 2. Different types of EPC (EPC can be subdivided into early and late EPC).

	Early EPC		Late EPC
Types of endothelial progenitor cells	Colony forming unit-Hill (CFU-Hill)	Circulating angiogenic cells (CAC)	Endothelial colony forming cells (ECFC)
Markers	CD34+, CD31+, CD45+, KDR+	CD34+, CD31+, CD45+, KDR+	CD34+, CD31+, CD45-, KDR+, CD144+, vWf+
Origin	Hematopoietic cells	Hematopoietic cells	Endothelial cell
Properties	Do not proliferate but express paracrine factors	Participate to angiogenesis through secretion of paracrine factors. Do not incorporate into vasculature and do not differentiate into endothelial cells	Participate to angiogenesis through differentiation into mature endothelial cells and incorporation into new vessels

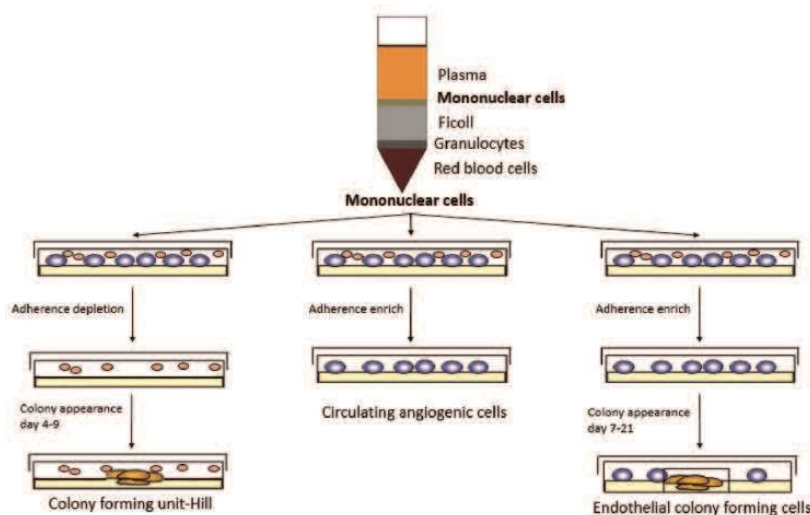


Fig. 5. Endothelial progenitor cell isolation. A Percoll gradient allowed to isolate mononuclear cells. These cells were cultivated in an endothelial based medium. Colony forming unit-Hill appeared 7–21 days after depletion of cells in suspension.

in order to analyze and compare the results of studies of EPC therapy. Late EPC, also called endothelial colony forming cells (ECFC),⁵⁰ can differentiate into specialized endothelial cells in the presence of appropriate stimuli.⁵¹ Hence, ECFC can repair damaged vessels or create new vessels.^{52–54} They can also release paracrine factors involved in angiogenesis.⁵⁵ Consequently, EPC appear to be good candidates for potential RV-targeted cell therapy in PAH. However, it should be kept in mind that, aside from a degree of controversy regarding their definition, isolation of adult EPC from peripheral blood does not yield enough cells for stem cell therapy. They need to be expanded in culture for several weeks in order to yield enough cells to provide a potential beneficial effect in PAH patients. Isolation of EPC from UCB yields considerably more EPC than is the case for adult blood, and these cells are fully functional.⁵⁶ However, since EPC cells are allogenic, their potential immune rejection needs to be given due consideration. At last, there is a lack of identification of the type of EPC making studies' conclusions hard to compare and translate to clinical practice.

Over the years, there have been many studies involving administration of autologous EPC as a treatment for PAH. However, there has been no consensual definition of EPC and the authors did not specifically target the RV in these studies.

Yip et al. observed a decrease in RVSP and RVH following intravenous tail vein injection of autologous BM-derived EPC in MCT-induced PAH rats.⁵⁷ Xia et al. similarly obtained positive results with EPC that were isolated from blood donors and injected into MCT-induced PAH nude rats.⁵⁸ Mirsky et al. injected CFU-Hill EPC into the tail vein, and they found no beneficial effect on MCT-induced PAH rats. They did not find cells in the lungs and the CFU-Hill EPC had low angiogenic capacities, which may explain these disappointing results.⁵⁹ In the study by Ormiston et al., early EPC rather than late EPC were able to prevent an MCT-induced increase in RVSP and RVH. Early EPC prevented PAH through an immune-dependent mechanism due to the production of anti-inflammatory cytokines.⁶⁰

Others have produced engineered EPC that either secrete prostacyclin⁶¹ or endothelial nitric oxide synthase (eNOS),⁶² which are strong pulmonary vasodilators. In both cases, engineered EPC, injected into the jugular vein of MCT-induced PAH rats, were more effective than control EPC in decreasing RVH and RVSP.

The combination of EPC with PAH drug therapies has also been studied. In MCT-induced PAH rats, EPC and sildenafil (a phosphodiesterase 5 inhibitor)⁶³ or cilostazol (a phosphodiesterase 3 inhibitor)⁶⁴ were effective in limiting the progression of PAH and they were more effective than EPC alone in attenuating RVSP and RV weight in MCT-induced PAH rats.

These results indicate that EPC may have a beneficial effect on the RV in animal models of PAH. However, the RV was not directly targeted and, as the lung circulation

was the main target, the authors did not search for EPC in the heart. As a result, there is no way to know whether the beneficial effects observed on the RV were a direct effect of the injected stem cells or whether these were because the stem cells induced an improvement in the pulmonary vascular disease. However, EPC appear to have a beneficial effect on pulmonary microvascular disease as all of the studies demonstrated improvements in pulmonary hemodynamics, the number of alveolar sacs and arterioles, and pulmonary microvessel thickening.

Cardiac progenitor cells

Cardiac progenitor cells (CPC) are a heterogeneous group of cells identified in adult heart; and they are characterized by the expression of c-Kit, Sca-1, and SSEA-1. The therapeutic potential of CPC has already been documented for myocardial infarction (MI).⁶⁵ They are thought to stimulate cardiomyocytes and vascular cell transdifferentiation, as well as secretion of paracrine factors that promote neo-vascularization and activation of endogenous CPC.⁶⁶ These properties could be beneficial to the RV in PAH by causing an increase in capillary density and by activating the production of "efficient" new cardiomyocytes. However, adult CPC isolation is an invasive procedure as these cells are isolated from the patient's heart tissue. On the other hand, although the use of embryo-derived CPC raises ethical issues, these can be circumvented by the use of autologous iPS cells (see below). Lastly, CPC include a large population of different cell types,⁶⁶ which makes it difficult to determine the one that will prove to be the most efficient. Similar to EPC, a clear identification and characterization of the cells used are crucial to discuss the results of studies.

In addition to CPC, cardiosphere derived cells (CDC) are an option, and they can be obtained from adult human biopsies. Explants are plated and the outgrowth cells derived from them self-assemble into cardiospheres that yield CDC once replated.^{67,68} Recent studies have shown that exosomes released from human CDC are cardioprotective. They have been shown to inhibit apoptosis, promote cardiomyocytes proliferation, and enhance angiogenesis by secretion of paracrine factors.^{69,70} In vivo, CDC administration in pigs with acute MI reduced the number of apoptotic cardiomyocytes in the infarct border zone and scar, decreased fibrosis, and increased vessel density. Thus, they can enhance left ventricular function by contributing to tissue repair. These results indicate that CDC can inhibit cardiomyocyte death after MI, thereby providing a degree of cardioprotection, while they can also confer long-lasting functional benefits for up to two months.⁷¹

CDC were tested clinically in the CADUCEUS trial (Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction), which examined the safety and efficacy of intracoronary autologous administration of CDC in patients with LV dysfunction after MI. The

administration of CDC did not lead to significant safety issues and it resulted in decreased infarct scar size and improved LV function at one year post treatment.⁶⁷ Moreover, the phase I of the ALLSTAR trial (ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration), which included MI patients, showed that intracoronary infusion of allogeneic CDC is safe, with minimal or no discernible immune reactions. The phase II trial will compare intracoronary CDC to a placebo in 120 patients.⁷² These findings suggest that exosomes from allogeneic CDC can be safely used in clinical applications. As for CPC isolation, CDC isolation requires heart explants and it is hence an invasive procedure.

Ischemic heart disease is associated with loss of cardiomyocytes, ultimately leading to pump failure in MI patients.⁷³ The use of CPC or CDC as stem cell therapies could prove to be useful to prevent cardiomyocyte apoptosis and fibrosis. To our knowledge, cardiomyocyte apoptosis has not been reported in PAH RV failure so far. Consequently, it is not clear whether using CPC or CDC in RV failure in PAH is relevant. However, this could nonetheless still be useful to reverse fibrosis and to increase angiogenesis in the dysfunctional right ventricle.

The safety and feasibility of epicardial administration of human embryonic stem cell derived CPC were assessed in a pig model mimicking RV volume overload of tetralogy of Fallot. Animals receiving cell therapy exhibited a decrease in RV fibrosis that did not lead to an improvement of the RV dysfunction observed in this model. None of the administered cells could be found in the myocardium. Given that these were human cells, immune rejection may have occurred. It is also possible that the hypoxic environment of the grafted cells affected CPC survival.⁷⁴

Adipose-derived stem cells

Adipose-derived stem cells (ADSC) can readily be isolated from white adipose tissue by liposuction and they are suitable for autotransplantation.⁷⁵ ADSC have wound healing potential as result of their ability to secrete angiogenic and anti-apoptotic growth factors such as granulocyte macrophage colony-stimulating factor, VEGF, hepatocyte

growth factor (HGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), and TGF- α .⁷⁶ ADSC can promote angiogenesis in models of hind limb ischemia by undergoing differentiation into endothelial cells which are incorporated into the walls of newly formed vessels and by secretion of paracrine factors.^{77,78} Nagata et al. compared ADSC isolated from subcutaneous, visceral, cardiac, and subscapular adipose tissues of mice, and they showed that the ADSC isolated from cardiac adipose tissue, when administered in a mouse MI model, proliferated better, while they also had the highest cardiac functional recovery and the highest rate of recruitment to ischemic myocardium. In fact, these cells had the potential to differentiate into cardiovascular lineage cells such as cardiomyocytes, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells.⁷⁹ Moreover, a phase I clinical trial of ADSCs has been conducted in patients with ischemic cardiomyopathy (PRECISE trial) to examine safety and feasibility, and it revealed significant improvements in left ventricular mass and a reduction of ischemia.⁸⁰ Consequently, ADSC appear to be a good choice of stem cells to treat the RV in PAH as, in addition to being autologous, plentiful, and readily obtainable, they can induce angiogenesis without undergoing apoptosis.

The use of ADSC in MCT-induced PAH rats has been shown to improve pulmonary vascular remodeling and to decrease RVH.⁸¹ Moreover, ADSC transduced to express cyclooxygenase-1 have been shown to attenuate MCT-induced PAH and RVH.⁸²

iPS derived cells

In 2006, Takahashi and Yamanaka demonstrated that it was possible to induce pluripotent stem cells from mouse embryonic or adult fibroblasts using a combination of specific factors. These cells are known as induced pluripotent stem (iPS) cells.⁸³ The generation of cardiomyocytes, endothelial cells, or smooth muscle cells from human iPS requires three steps: reprogramming of human fibroblasts into iPS; differentiation of iPS into the desired cell type; and purification and transplantation of these iPS-derived cells (Fig. 6). As several hundred million cells are required for cardiac regenerative therapy, an efficient method of production is

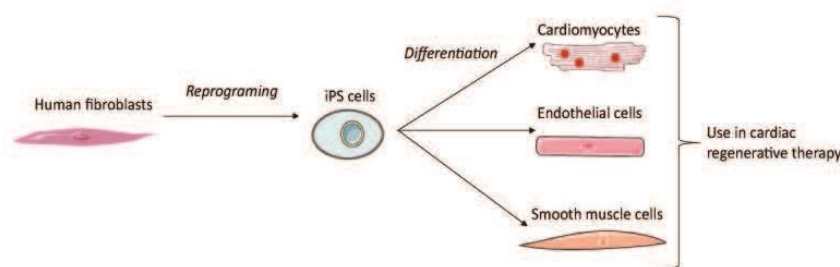


Fig. 6. Generation of cell derived iPS for cardiac regenerative therapy. The reprogramming of adult fibroblasts thanks to a combination of specific factors leads to generation of induced pluripotent cells. These cells can be differentiated into the desired cell type for cardiac regenerative therapy.

needed. However, preparing pure cardiomyocytes without a purification step entails a risk of contamination by tumor-initiating cells.⁸⁴ Interestingly, intramyocardial transplantation of human iPSC-derived cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells into a pig MI model showed that human iPSC-derived cardiomyocytes can integrate into host myocardium and generate organized sarcomeric structures, while endothelial and smooth muscle cells contribute to the host vasculature. This trilineage cell transplantation can significantly improve left ventricular function and angiogenesis, while reducing infarct size and cell apoptosis.⁸⁵ iPS may hence provide a useful source of patient-specific cells, as they can be isolated from their own dermal fibroblasts.

The benefits of iPS cell transplantation in MCT-induced PAH rats on the hemodynamic function of the RV were assessed in the study by Huang et al. Tail vein administration of murine iPS cells was performed once per week for a period of one month. A significant decrease in RVH, RVSP, and lung tissue inflammation were observed.⁸⁶ However, due to their embryonic stem cell-like properties, iPS cells are tumorigenic.⁸⁷ Hence, to overcome the problem of tumorigenesis, in a lot of studies the iPS cells were made to differentiate *in vitro* into cardiomyocytes, or other cell types, before being transplanted into the animal model hosts. As there was no mention of tumor formation in study by Huang et al., the use of undifferentiated iPS cells may in fact be inconsequential in this regard. Thus, the administration of iPS derived from cardiomyocytes and endothelial cells, as used in the study by Lei Ye et al.,⁸⁵ directly into the RV in a PAH model may be a suitable approach.

Once again, it is important to emphasize that when stem cells therapies are not administered directly into the RV, beneficial effects on RV function may well be mediated through their action on the pulmonary unit and more precisely through the reduction of afterload. Preclinical studies of stem cell therapy for pulmonary hypertension are resumed in Table 3 and the markers of these stem cells are referenced in Figure 7.

What are the best stem cells to target the right ventricle in PAH? (Table 4)

The use of cells isolated from autologous umbilical cord blood and embryo-derived cells, such as CPC, can be subject to ethical concerns and legal restrictions, as well as immunological issues. The use of iPS may be a suitable option to overcome these issues as they are derived from somatic cells and they are genetically identical to the patient. However, their reprogramming may induce genetic changes that could lead to tumor initiation.^{88,89} For practical reasons, the cells should be readily available at the right clinical dose at the time of injection. This means that the isolated cells need to have previously undergone cryopreservation, even though this is not optimal for maintaining cell properties. Indeed, there is still a considerable need for new approaches to

optimize cryopreservation.⁹⁰ As RV failure in the context of PAH is a chronic condition, patient-specific manufacture of autologous cell products could be viewed to be more suitable approach than isolating cells from the patient in advance and freezing them. However, as with other cardiovascular pathologies, it has been shown in idiopathic PAH (iPAH) patients that the number of EPC are lower compared to healthy patients.⁹¹ There are three options to address this: isolation of cells from the patient before the pathology is established (from UCB or from a peripheral blood sample taken during childhood); use of an allogenic stem cells source (from a stem cell-derived UCB bank); or use of iPS cells derived from the patient's own fibroblasts.

The outcomes of preclinical and clinical studies regarding stem cell therapy for heart diseases depend on the type of cells as well as the route of administration. Finally, while promoting angiogenesis may be beneficial for improving RV function, it may be detrimental for pulmonary vascular remodeling in PAH patients. An adequate degree of care should hence be taken to choose the best cells and the best way to administer these cells to the heart so as to avoid detrimental side effects on the pulmonary circulation.⁹²

Potential administration routes (Fig.8)

Intravenous delivery of stem cells is the easiest and least invasive option for administration. It is a feasible and low-risk route. However, it has been shown that the retention rate in the heart is poor with this method of administration.⁹³

Intracoronary delivery is one of the most commonly used methods for administration. Intracoronary injection using various cell types has already been tried and tested in several clinical trials, and have proven its safety and effectiveness. However, this technique involves a risk of coronary occlusion or microvascular obstruction by the infused cells, which can lead to myocardial infarct. Intracoronary administration appears to have a lower efficiency in terms of myocardial cell retention compared to intracardiac administration.⁹⁴

Intracardiac delivery is the most effective and invasive route for administration.⁹³ It can be divided into two subtypes: epicardial and transendocardial injection. Vrtovec et al. compared intracoronary versus transendocardial CD34+ cell delivery in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy, and they found that transendocardial delivery was associated with a better clinical response due to a higher level of myocardial cell retention.⁹⁵ Although the intracardiac administration route appears to be optimal in terms of cell retention, this method is invasive and it entails a risk of ventricle wall perforation and cardiac arrhythmias.⁹⁶

Cells are released in a new and damaged environment, as opposed to the ideal environment in which they were

Table 3. Preclinical studies of stem cell therapy for pulmonary hypertension.

Models	Cell type	Route of administration	Pulmonary effect	Direct / indirect RV effect	Found cell engraftment	Study primarily designed for RV effects	Authors	
Pre clinical study MCT rats	EPC	Intravenous	↓connexin43, eNOS expression, ↑ alveolar sacs, ↑ small lung arterioles	Indirect. ↓RVSP, ↓RVH, ↓connexin43, eNOS expression	In pulmonary arterioles	No	Yip et al., 2008	
			↑ n small lung arterioles, ↓ pulmonary arteriole muscularization	Indirect. ↓RVSP, ↓RVH	In small pulmonary arterioles	No	Xia et al., 2009	
			↓ pulmonary arteriole muscularization	Indirect. ↓RVSP, ↓RVH	In lung tissue after 15 min but not 24h after injection	No	Ormiston et al., 2009	
	EPC producing prostacyclin	Intravenous	∅	∅	∅	∅	No	Mirsky et al., 2011
			↓ pulmonary vessel wall thickening, ↓ cell proliferation in pulmonary vessel wall	Indirect. ↓RVSP, ↓RVH	In lungs up to 25 days	No	Zhou et al., 2013	
	eNOS transduced EPC	Intravenous	↓ pulmonary arteriole muscularization, ↑ microvascular perfusion	Indirect. ↓RVSP, ↓RVH	In distal arterioles	No	Zhao et al., 2005	
			↑ alveolar sacs, ↑ small lung arterioles, ↓ apoptic and inflammatory biomarkers	Indirect. ↓ apoptic and inflammatory biomarkers, ↓RVSP, ↓RV weigh	∅	No	Yen et al., 2013	
	EPC + sildenafil	Intravenous	↑ alveolar sacs, ↑ small lung arterioles	Indirect. ↓connexin43, eNOS expression, ↓RVSP, ↓RV weigh	In pulmonary arterioles	No	Sun et al., 2009	
			∅	Indirect. ↓RVDP, ↓RVH, ↓RVEF	∅	No	Umar et al., 2009	
	EPC + cilostazol	Intravenous	↓ thickening of arterioles and alveolar septa	Indirect. ↓RVP, ↓RVH, ↓mRVP	Lung tissue	No	Lee et al., 2015	
∅			∅	∅	No	∅		
MSC	Intravenous	↓ intra-acinar muscular pulmonary arteries	Indirect. ↓RVSP, ↓RVH	Pulmonary vessels	No	Yuelin Zhang et al., 2012		
		↓ media wall thickness, ↑ capillary density	Indirect. ↓RVH	Lung	No	Baber et al., 2006		
MSC primed with SIP	Intratracheal	↓PAP, ↓PVR	Indirect. ↓RVSP, ↓RV/ (LV+S)	∅	No	Kang et al., 2015		
		↓ pulmonary vascular wall thickness, ↑ capillary density	∅	∅	No	∅		

(continued)

Table 3. Continued

Models	Cell type	Route of administration	Pulmonary effect	Direct / indirect RV effect	Found cell engraftment	Study primarily designed for RV effects	Authors
	MSC expressing Heme Oxygenase-1	Intravenous	↓ media wall thickness, ↓ inflammation	Indirect. ↓RVSP, ↓RVH	Lung	No	Liang et al., 2010
	MSC overexpressing eNOS	Intravenous	∅	Direct. ↓RVSP, ↓RV weight/body weight	∅	No	Kanki Horimoto et al., 2006
	ADSC	Intravenous	↓mPAP, ↓wall/lumen thickness, ↓wall/lumen area	Indirect. ↓RVH	Lung tissue	No	Luo et al., 2014
	ADSC expressing COX-1	Intratracheal	↓mPAP, ↓vascular remodeling	Indirect. ↓RVH, ↓RV mass	Lung parenchyma	No	Somanna et al., 2014
	iPS cells	Intravenous	↓wall/lumen thickness, ↓lung tissue inflammation (IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, IFNγ)	Direct. ↓RVH, ↓RVSP	Lung parenchyma	No	Huang et al., 2016
Left to right shunt rat	MSC	Intravenous	↓mPAP, ↓media thickness, ↓intima thickness, ↓pulmonary arteries luminal area, ↓inflammation factors	Indirect. ↓RV/(LV+S), ↓RVSP, ↓mRVP, ↓RV/body weight	∅	No	Luan et al.
LV pressure overload with biventricular failure in rat	MSC	Intracoronary	∅	Direct. ↓RVSP, ↓RVDP, ↓inflammation, apoptosis and ECM remodeling markers	∅	No	Molina et al., 2008
RV volume overload piglet	CPC	Epicardial	∅	Direct. ↓in peri-myocytes fibrosis, protection against arrhythmia	No cell survival in RV at 3 months	No	Lambert et al., 2015
RV volume overload sheep	MNC	Epicardial	∅	Direct. Improved RV diastolic function under dobutamine stress, ↑capillary density	∅	No	Yerebakan et al., 2009

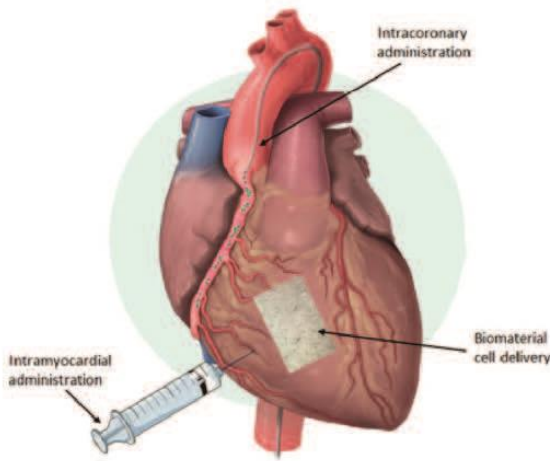


Fig. 8. Routes of administration for stem cell therapy targeting the right ventricle in PAH.

cultured before the injection. As a result, cell death and cell retention are two major problems that still need to be solved. To enhance cell survival and delivery, the addition of biomaterials that mimic or that are derived from ECM have undergone assessment in recent years (e.g. Matrigel®, decellularized ECM, hyaluronic acid, and collagen).⁹⁷ The goal of this approach is to use biocompatible biomaterials as an ideal environment for cell survival that could permit continuous cell delivery to organs. The currently available biomaterial delivery systems are patches that can be applied on the surface of the organ and injectable hydrogel that can be incorporated in the organ and 3D scaffold.^{98,99}

Clinical studies targeting the right ventricle (Table 5)

Rupp et al. reported the first case of intracoronary infusion of autologous BM-derived progenitor cells in an infant of 11 months who was afflicted with hypoplastic left heart syndrome (HLHS). HLHS is a very serious type of CHD, also known as “univentricular heart syndrome,” which is characterized by hypoplasia of the LV and that ultimately leads to RV failure. Three months after administration, it was found that the RVEF had increased and that the RV function had dramatically improved.¹⁰⁰ A second study was performed in nine children with severe terminal heart failure for whom a heart transplant remained the last option. These children were treated by intracoronary infusion of autologous BM-derived MNC. This study showed improvement in terms of the NYHA classification and an increase in the LVEF.¹⁰¹

The Mayo Clinic carried out a stem cell trial in 2014 to treat children with HLHS. This clinical trial aimed to determine the safety and feasibility of injections of autologous UCB-MNC cells into the RV of HLHS children undergoing a particular surgical procedure. The investigators sought to investigate whether autologous UCB could strengthen the RV muscle.¹⁰²

The first case report of intraoperative intramyocardial injection of autologous UCB yielded encouraging findings, such as a progressive improvement in the RVEF over the course of the subsequent three months. However, it is not clear whether the improvement resulted from the regenerative therapy or from the surgical procedure that was performed.¹⁰³

Table 4. Comparing cell types suitable for stem cell therapy targeting the right ventricle in pulmonary hypertension patients.

Cell type	Advantages	Drawbacks	Targets
Mononuclear stem cells	- Easy to isolate - The isolation gives a lot of cells	- Include a lot of cell type	- Pro-angiogenic - Anti-fibrotic
Mesenchymal stromal cells	- Can be isolated from different tissues - Immune compatible	- Their functions can be different depending on their origin	- Pro-angiogenic - Anti-apoptotic - Anti-inflammatory
Endothelial progenitor cells	- Can differentiate into specialized endothelial cells - Their isolation is minimally invasive	- Difficult to identify - Have to be expanded in culture for a few weeks to have enough cells to administrate	- Pro-angiogenic
Cardiac progenitor cells	- Can activate endogenous CPC to promote the production of new “efficient” cardiomyocytes	- Very invasive procedure to isolate them: heart biopsies	- Pro-angiogenic - Promotion of cardiomyocyte proliferation
Cardiosphere derived cells	- Cardioprotective	- Very invasive procedure to isolate them: heart biopsies	- Pro-angiogenic - Anti-apoptotic - Promotion of cardiomyocyte proliferation
Adipose-derived stem cells	- Easy to isolate - Suitable for autotransplantation	- Invasive procedure to isolate them: liposuccion	- Pro-angiogenic - Anti-apoptotic
iPS derived cells	- Can provide a source of patient-specific cells	- Difficult to purify cells - Risk of tumor initiating cells	The effect will depend on the cell type derived from iPS cells

Table 5. Clinical studies of stem cell therapy for pulmonary hypertension.

	Pathology	Patients (n)	Type of cells	Method of cell transplantation	State	Results	Authors
Clinical study PHACeT (phase I) 2010	iPAH	7	eNOS-enhanced endothelial progenitor cells	PA injection	Completed	-Improvement in exercise tolerance - No hemodynamic improvement	Granton et al., 2015
TICAP (phase I) 2012	Hypoplastic left heart syndrome	14 (7 treated and 7 control)	Cardiosphere derived cells	Direct injection in the right and the left coronary arteries	Completed	- Improved RV function at 36 months after staged cardiac reconstruction	Ishigami et al., 2015
PERSEUS (phase 2) 2018	Hypoplastic left heart syndrome	X	Cardiosphere derived cells	Direct injection in the right and the left coronary arteries	Recruiting	X	Mayo Clinic

Wang et al. investigated the feasibility, safety, and clinical outcomes of intravenous infusion of autologous EPC in patients with iPAH. They did not specifically study RV function in these patients, although they did find a significant improvement in mPAP, PVR, and cardiac output. This preliminary study showed that transplantation of autologous EPC may be beneficial in patients with iPAH.¹⁰⁴ The same type of study has been carried out in children with iPAH, and the outcome was similar: intravenous infusion of autologous EPC was feasible and associated with improvements in exercise capacity and pulmonary hemodynamics.¹⁰⁵ The PHACeT trial aimed to evaluate the safety of injecting EPC transfected with eNOS in PAH patients who were refractory to PAH-specific therapies. Three deliveries of transfected EPC were performed in the right atrium in seven patients. Although once again the RV function was not studied, this trial nonetheless showed that the cell infusion was well tolerated and that the 6-min walk distance (6MWD) was significantly increased at one, three, and six months.¹⁰⁶

The TICAP (Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor cells) Phase I clinical trial for pediatric patients with CHD, using autologous CPC, was recently concluded. Autologous CPC were isolated from seven children with HLHS and delivered by intracoronary administration. Eighteen months after the cell administration, the CPC-treated patients exhibited an improvement in RVEF and clinical status compared to the control patients who received palliation surgery without cell therapy.^{107,108}

Perspectives

To date, all of the stem cells clinical trials targeting PAH have focused on pulmonary vascular disease. Whether the observed concomitant improvement of RV function resulted from a stem cell effect rather than an improvement in pulmonary hemodynamics remains unknown. These trials have nonetheless demonstrated that transcoronary, transatrial, and intravenous stem cell administrations are feasible,

safe, and reliable. To our knowledge, the only stem cell trial in regard to RV in pediatric patients with CHD showed RV function and clinical improvement. Indeed, clinical studies involving the administration of stem cells are more developed in regard to heart defects where the LV is affected, such as the SCIPIO clinical trial.¹⁰⁹ This trial revealed that autologous intracoronary administration of CSC in patients with ischemic cardiomyopathy led to improvement in the overall and regional LV function. A phase II clinical trial (MSC-HF),¹¹⁰ where endocardial administration of autologous BM-MSC was performed in patients with chronic ischemic heart disease, also showed improvement in LV function. A phase I trial has assessed the safety and feasibility of the epicardial transplantation of skeletal myoblast in patients with ischemic cardiomyopathy (CAuSMIC).¹¹¹ Vrtovec and his team employed CD34+ cells, and they studied intracoronary administration in patients who either had dilated cardiomyopathy¹¹² or non-ischemic dilated cardiomyopathy.¹¹³ They also studied transendocardial administration in patients with ischemic cardiomyopathy.¹¹⁴ All of their studies revealed an increase in LVEF and the 6MWD, a decrease in N-terminal pro-BNP, and improved long-term survival.

Given that administration of stem cells targeting the LV has already been shown to yield clinical benefits, there is ample reason to similarly use stem cells to treat the RV. RV function is the main determinant of survival in patients with PAH.¹ We hypothesize that reinforcing the RV rather than trying to treat the lungs in PAH could be an alternative approach to increasing patient survival.

The vast majority of LV cell therapy studies examined cells delivery after MI. Here we proposed a scenario where cells would be delivered into a maladaptive RV that is continuously exposed to a pathologically elevated PAP which is different from what is already done in the LV where cells are delivered following an acute injury. Even if the injected cells are able to promote cardiomyocyte regeneration or enhance capillary density, one may wonder if these effects will persist in the face of the persistent increased PAP. For this reason,

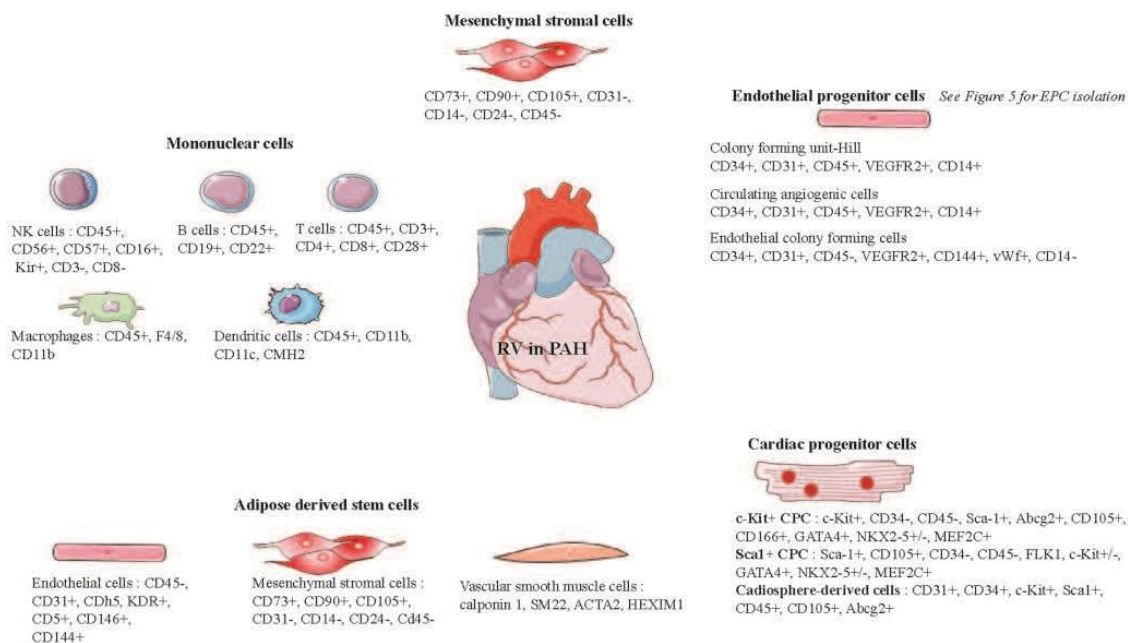


Fig. 7. Representative markers of stem cells usable for right ventricle cell therapy.

we believe that further studies are needed to address the sustained effect of RV stem cell therapy as well as the role of repeated injections, keeping in mind that RV cell therapy should be performed as part of a multimodality treatment targeting the RV and the pulmonary circulation.

Lastly, the main mode of action of stem cells may in fact involve a paracrine effect, as it is difficult to determine whether the cells are actually incorporated into the organ. Using exosomes or cell-derived products may be a way to avoid immune reaction while still yielding similar outcomes. Promising results in this regard have been published from a study involving MCT rats.¹¹⁵

As previously mentioned, it is difficult to compare the results of preclinical and clinical trials of RV stem cell therapy as the exact nature of delivered cells remains undetermined. Hence, there is an urgent necessity to move to standardized stem cell identification before use. For instance, there is large evidence of the heterogeneity of CPC population⁶⁶ which may have different role in cardiac regeneration. Another important point is the evaluation of the mechanism of action of cardiac cell therapy which remains understudied. Few studies have designed *in vitro* experiments to elucidate potential mechanism of action showing that the effect of EPC therapy after MI involved IGF and TGFβ pathways.^{116,117} Further studies are needed to better understand how cell therapy could help the right ventricle of PAH patients.

Conclusions

Cell therapy holds promise in terms of providing support for RV function in PAH patients. Encouraging results have been published that highlight the feasibility, safety, and

efficiency of such therapeutic approaches. Further studies are needed, however, to evaluate RV stem cell therapy in addition to pulmonary vessel therapy as an established therapy before transplantation can be used to treat PAH patients.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declare that there is no conflict of interest.

Funding

This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the second Investissements d’Avenir program (reference: ANR-15-RHUS-0002) and RHU BioartLung 2020.

References

- Ghio S, Gavazzi A, Campana C, et al. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(1): 183–188.
- Rosenzweig A. Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1274–1277.
- Povsic TJ. Current state of stem cell therapy for ischemic heart disease. *Curr Cardiol Rep* 2016; 18(2): 17.
- Gurtu V and Michelakis ED. Emerging therapies and future directions in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol* 2015; 31(4): 489–501.
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(25 Suppl): D34–41.
- Hoepfer MM, Simon R and Gibbs J. The changing landscape of pulmonary arterial hypertension and implications for patient care. *Eur Respir Rev* 2014; 23(134): 450–457.

7. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, et al. Management of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65(18): 1976–1997.
8. Ghio S, Gavazzi A, Campana C, et al. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(1): 183–188.
9. Ryan JJ, Huston J, Kutty S, et al. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol* 2015; 31(4): 391–406.
10. Harrison A, Hatton N and Ryan JJ. The right ventricle under pressure: evaluating the adaptive and maladaptive changes in the right ventricle in pulmonary arterial hypertension using echocardiography (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* 2015; 5(1): 29–47.
11. Ryan JJ and Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res* 2014; 115(1): 176–188.
12. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(25 Suppl): D22–33.
13. Ryan JJ and Archer SL. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension: part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2015; 131(19): 1691–1702.
14. Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* 2009; 120(20): 1951–1960.
15. Ruitter G, Ying Wong Y, de Man FS, et al. Right ventricular oxygen supply parameters are decreased in human and experimental pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32(2): 231–240.
16. Gómez A, Bialostozky D, Zajarias A, et al. Right ventricular ischemia in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(4): 1137–1142.
17. Sutendra G, Dromparis P, Paulin R, et al. A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91(11): 1315–1327.
18. Sarashina T, Nakamura K, Akagi S, et al. Reverse right ventricular remodeling after lung transplantation in patients with pulmonary arterial hypertension under combination therapy of targeted medical drugs. *Circ J* 2017; 81(3): 383–390.
19. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, et al. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol* 2009; Chapter 7: Unit 7.1.
20. Peters EB, Liu B, Christoforou N, et al. Umbilical cord blood-derived mononuclear cells exhibit pericyte-like phenotype and support network formation of endothelial progenitor cells in vitro. *Ann Biomed Eng* 2015; 43(10): 2552–2568.
21. Rohban R, Prietl B and Pieber TR. Crosstalk between stem and progenitor cellular mediators with special emphasis on vasculogenesis. *Transfus Med Hemotherapy* 2017; 44(3): 174–182.
22. Oommen S, Yamada S, Cantero Peral S, et al. Human umbilical cord blood-derived mononuclear cells improve murine ventricular function upon intramyocardial delivery in right ventricular chronic pressure overload. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 50.
23. Smith AR and Wagner JE. Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2009; 147(2): 246–261.
24. Cantero Peral S, Burkhart HM, Oommen S, et al. Safety and feasibility for pediatric cardiac regeneration using epicardial delivery of autologous umbilical cord blood-derived mononuclear cells established in a porcine model system. *Stem Cells Transl Med* 2015; 4(2): 195–206.
25. Yerebakan C, Sandica E, Prietz S, et al. Autologous umbilical cord blood mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of chronic right ventricular volume overload. *Cell Transplant* 2009; 18(8): 855–868.
26. Davies B, Elwood NJ, Li S, et al. Human cord blood stem cells enhance neonatal right ventricular function in an ovine model of right ventricular training. *Ann Thorac Surg* 2010; 89(2): 585–593.
27. Fernández Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, et al. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? *Differ Res Biol Divers* 2013; 85(1–2): 1–10.
28. van der Laarse A, Cobbaert CM and Umar S. Stem and progenitor cell therapy for pulmonary arterial hypertension: effects on the right ventricle (2013 Grover Conference Series). *Pulm Circ* 2015; 5(1): 73–80.
29. Burlacu A, Grigorescu G, Rosca A-M, et al. Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro. *Stem Cells Dev* 2013; 22(4): 643–653.
30. Castro-Manreza ME and Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res* 2015; 2015: 394917.
31. Rankin S. Mesenchymal stem cells. *Thorax* 2012; 67(6): 565–566.
32. Hass R, Kasper C, Böhm S, et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011; 9: 12.
33. Umar S, de Visser YP, Steendijk P, et al. Allogenic stem cell therapy improves right ventricular function by improving lung pathology in rats with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297(5): H1606–1616.
34. Lee H, Lee JC, Kwon JH, et al. The effect of umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells in monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension rats. *J Korean Med Sci* 2015; 30(5): 576–585.
35. Luan Y, Zhang X, Kong F, et al. Mesenchymal stem cell prevention of vascular remodeling in high flow-induced pulmonary hypertension through a paracrine mechanism. *Int Immunopharmacol* 2012; 14(4): 432–437.
36. Zhang Y, Liao S, Yang M, et al. Improved cell survival and paracrine capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells promote therapeutic potential for pulmonary arterial hypertension. *Cell Transplant* 2012; 21(10): 2225–2239.
37. Baber SR, Deng W, Master RG, et al. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(2): H1120–1128.
38. Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, et al. Implantation of mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric

- oxide synthase improves right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension. *Circulation* 2006; 114(1 Suppl): I181–185.
39. Liang OD, Mitsialis SA, Chang MS, et al. Mesenchymal stromal cells expressing heme oxygenase-1 reverse pulmonary hypertension. *Stem Cells* 2011; 29(1): 99–107.
 40. Kang H, Kim K-H, Lim J, et al. The therapeutic effects of human mesenchymal stem cells primed with sphingosine-1 phosphate on pulmonary artery hypertension. *Stem Cells Dev* 2015; 24(14): 1658–1671.
 41. Molina EJ, Palma J, Gupta D, et al. Right ventricular effects of intracoronary delivery of mesenchymal stem cells (MSC) in an animal model of pressure overload heart failure. *Biomed Pharmacother* 2009; 63(10): 767–772.
 42. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang S-Y, et al. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res* 2008; 103(2): 194–202.
 43. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964–967.
 44. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol (1985)* 2003; 95(5): 2081–2088.
 45. Tilling L, Chowieczyk P and Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68(4): 484–492.
 46. Madonna R and De Caterina R. Circulating endothelial progenitor cells: Do they live up to their name? *Vascul Pharmacol* 2015; 67–69: 2–5.
 47. Mukai N, Akahori T, Komaki M, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res* 2008; 314(3): 430–440.
 48. Cheng C-C, Chang S-J, Chueh Y-N, et al. Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses. *BMC Genomics* 2013; 14: 182.
 49. Fadini GP, Losordo D and Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res* 2012; 110(4): 624–637.
 50. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, et al. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(5): 1316–1320.
 51. Boyer-Di Ponio J, El-Ayoubi F, Glacial F, et al. Instruction of circulating endothelial progenitors in vitro towards specialized blood-brain barrier and arterial phenotypes. *PLoS One* 2014; 9(1): e84179.
 52. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; 105(11): 1527–1536.
 53. Flex A, Biscetti F, Iachininoto MG, et al. Human cord blood endothelial progenitors promote post-ischemic angiogenesis in immunocompetent mouse model. *Thromb Res* 2016; 141: 106–111.
 54. Peng X-G, Bai Y, James JR, et al. Transplanted endothelial progenitor cells improve ischemia muscle regeneration in mice by diffusion tensor MR imaging. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 3641401.
 55. Kim S-W, Jin HL, Kang S-M, et al. Therapeutic effects of late outgrowth endothelial progenitor cells or mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood on infarct repair. *Int J Cardiol* 2016; 203: 498–507.
 56. Au P, Daheron LM, Duda DG, et al. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood* 2008; 111(3): 1302–1305.
 57. Yip H-K, Chang L-T, Sun C-K, et al. Autologous transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Crit Care Med* 2008; 36(3): 873–880.
 58. Xia L, Fu G-S, Yang J-X, et al. Endothelial progenitor cells may inhibit apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells: new insights into cell therapy for pulmonary arterial hypertension. *Cytotherapy* 2009; 11(4): 492–502.
 59. Mirsky R, Jahn S, Koskenvuo JW, et al. Treatment of pulmonary arterial hypertension with circulating angiogenic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 301(1): L12–19.
 60. Ormiston ML, Deng Y, Stewart DJ, et al. Innate immunity in the therapeutic actions of endothelial progenitor cells in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 43(5): 546–554.
 61. Zhou L, Chen Z, Vanderslice P, et al. Endothelial-like progenitor cells engineered to produce prostacyclin rescue monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and provide right ventricle benefits. *Circulation* 2013; 128(9): 982–994.
 62. Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, et al. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 2005; 96(4): 442–450.
 63. Yen C-H, Tsai T-H, Leu S, et al. Sildenafil improves long-term effect of endothelial progenitor cell-based treatment for monocrotaline-induced rat pulmonary arterial hypertension. *Cytotherapy* 2013; 15(2): 209–223.
 64. Sun C-K, Lee F-Y, Sheu J-J, et al. Early combined treatment with cilostazol and bone marrow-derived endothelial progenitor cells markedly attenuates pulmonary arterial hypertension in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 330(3): 718–726.
 65. Tian S, Liu Q, Gnatovskiy L, et al. Heart regeneration with embryonic cardiac progenitor cells and cardiac tissue engineering. *J Stem Cell Transplant Biol* 2015; 1(1): 104.
 66. Le T and Chong J. Cardiac progenitor cells for heart repair. *Cell Death Discov* 2016; 2: 16052.
 67. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUtologous stem Cells to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(2): 110–122.
 68. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; 95(9): 911–921.
 69. Ibrahim AG-E, Cheng K and Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep* 2014; 2(5): 606–619.
 70. Barile L, Lionetti V, Cervio E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014; 103(4): 530–541.
 71. Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, et al. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct

- size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2015; 8(2): 322–332.
72. Chakravarty T, Makkar RR, Ascheim DD, et al. ALLogeneic Heart STEM Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: rationale and design. *Cell Transplant* 2017; 26(2): 205–214.
 73. Konstantinidis K, Whelan RS and Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(7): 1552–1562.
 74. Lambert V, Gouadon E, Capderou A, et al. Right ventricular failure secondary to chronic overload in congenital heart diseases: benefits of cell therapy using human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 149(3): 708–715.e1.
 75. Rapisò E, Simonacci F and Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Ann Med Surg (Lond)* 2017; 20: 87–91.
 76. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10): 1292–1298.
 77. Cao Y, Sun Z, Liao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332(2): 370–379.
 78. Kim EK, Li G, Lee TJ, et al. The effect of human adipose-derived stem cells on healing of ischemic wounds in a diabetic nude mouse model. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128(2): 387–394.
 79. Nagata H, Ii M, Kohbayashi E, et al. Cardiac adipose-derived stem cells exhibit high differentiation potential to cardiovascular cells in C57BL/6 mice. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(2): 141–151.
 80. Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sánchez PL, et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J* 2014; 168(1): 88–95.e2.
 81. Luo L, Lin T, Zheng S, et al. Adipose-derived stem cells attenuate pulmonary arterial hypertension and ameliorate pulmonary arterial remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2015; 37(3): 241–248.
 82. Somanna NK, Wörner PM, Murthy SN, et al. Intratracheal administration of cyclooxygenase-1-transduced adipose tissue-derived stem cells ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307(8): H1187–1195.
 83. Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663–676.
 84. Tohyama S and Fukuda K. Safe and effective cardiac regenerative therapy with human-induced pluripotent stem cells: how should we prepare pure cardiac myocytes? *Circ Res* 2017; 120(10): 1558–1560.
 85. Ye L, Chang Y-H, Xiong Q, et al. Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell* 2014; 15(6): 750–761.
 86. Huang W-C, Ke M-W, Cheng C-C, et al. Therapeutic benefits of induced pluripotent stem cells in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* 2016; 11(2): e0142476.
 87. Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, et al. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev* 2013; 22(1): 37–50.
 88. Yamakawa H and Ieda M. Strategies for heart regeneration: approaches ranging from induced pluripotent stem cells to direct cardiac reprogramming. *Int Heart J* 2015; 56(1): 1–5.
 89. Barad L, Schick R, Zeevi-Levin N, et al. Human embryonic stem cells vs human induced pluripotent stem cells for cardiac repair. *Can J Cardiol* 2014; 30(11): 1279–1287.
 90. Hunt CJ. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. *Transfus Med Hemother* 2011; 38(2): 107–123.
 91. Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, et al. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2008; 102(7): 1073–1079.
 92. Chen H, Strappe P, Chen S, et al. Endothelial progenitor cells and pulmonary arterial hypertension. *Heart Lung Circ* 2014; 23(7): 595–601.
 93. Golpanian S, Schulman IH, Ebert RF, et al. Concise review: review and perspective of cell dosage and routes of administration from preclinical and clinical studies of stem cell therapy for heart disease. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(2): 186–191.
 94. Hou D, Youssef EA-S, Brinton TJ, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl): I150–156.
 95. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, et al. Comparison of trans-endocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2013; 128(11 Suppl 1): S42–49.
 96. Menasché P. Stem cell therapy for heart failure: are arrhythmias a real safety concern? *Circulation* 2009; 119(20): 2735–2740.
 97. Hinderer S, Brauchle E and Schenke-Layland K. Generation and assessment of functional biomaterial scaffolds for applications in cardiovascular tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Healthc Mater* 2015; 4(16): 2326–2341.
 98. Parsa H, Ronaldson K and Vunjak-Novakovic G. Bioengineering methods for myocardial regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 96: 195–202.
 99. Silvestri A, Boffito M, Sartori S, et al. Biomimetic materials and scaffolds for myocardial tissue regeneration. *Macromol Biosci* 2013; 13(8): 984–1019.
 100. Rupp S, Zeiher AM, Dimmeler S, et al. A regenerative strategy for heart failure in hypoplastic left heart syndrome: intracoronary administration of autologous bone marrow-derived progenitor cells. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29(5): 574–577.
 101. Rupp S, Jux C, Bönig H, et al. Intracoronary bone marrow cell application for terminal heart failure in children. *Cardiol Young* 2012; 22(5): 558–563.
 102. Avolio E, Caputo M and Madeddu P. Stem cell therapy and tissue engineering for correction of congenital heart disease. *Front Cell Dev Biol* 2015; 3: 39.
 103. Burkhardt HM, Qureshi MY, Peral SC, et al. Regenerative therapy for hypoplastic left heart syndrome: first report of intraoperative intramyocardial injection of autologous

- umbilical-cord blood-derived cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 149(3): e35–37.
104. Wang X-X, Zhang F-R, Shang Y-P, et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(14): 1566–1571.
105. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, et al. Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Pediatr Transplant* 2008; 12(6): 650–655.
106. Granton J, Langleben D, Kutryk MB, et al. Endothelial NO-synthase gene-enhanced progenitor cell therapy for pulmonary arterial hypertension: The PHACeT Trial. *Circ Res* 2015; 117(7): 645–654.
107. Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, et al. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial. *Circ Res* 2015; 116(4): 653–664.
108. Si M-S and Ohye RG. Stem cell therapy for the systemic right ventricle. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2017; 15(11): 813–23.
109. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, et al. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation* 2012; 126(11 Suppl 1): S54–64.
110. Mathiasen AB, Jørgensen E, Qayyum AA, et al. Rationale and design of the first randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intramyocardial injection of autologous bone-marrow derived Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure (MSC-HF Trial). *Am Heart J* 2012; 164(3): 285–291.
111. Dib N, Dinsmore J, Lababidi Z, et al. One-year follow-up of feasibility and safety of the first U.S., randomized, controlled study using 3-dimensional guided catheter-based delivery of autologous skeletal myoblasts for ischemic cardiomyopathy (CAuSMIC study). *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2(1): 9–16.
112. Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, et al. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2011; 17(4): 272–281.
113. Lezaic L, Socan A, Poglajen G, et al. Intracoronary transplantation of CD34(+) cells is associated with improved myocardial perfusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2015; 21(2): 145–152.
114. Poglajen G, Sever M, Cukjati M, et al. Effects of transendocardial CD34 + cell transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Interv* 2014; 7(4): 552–559.
115. Aliotta JM, Pereira M, Wen S, et al. Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. *Cardiovasc Res* 2016; 110(3): 319–330.
116. Doyle B, Sorajja P, Hynes B, et al. Progenitor cell therapy in a porcine acute myocardial infarction model induces cardiac hypertrophy, mediated by paracrine secretion of cardirotrophic factors including TGFbeta1. *Stem Cells Dev* 2008; 17(5): 941–951.
117. Hynes B, Kumar AHS, O'Sullivan J, et al. Potent endothelial progenitor cell-conditioned media-related anti-apoptotic, cardirotrophic, and pro-angiogenic effects post-myocardial infarction are mediated by insulin-like growth factor-1. *Eur Heart J* 2013; 34(10): 782–789.

Annexe 2 : Poster présenté lors du congrès « 3rd European Spring School on Venous Thromboembolism » 2017

What is the best endothelial progenitor cells delivery method for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension induced right ventricle dysfunction?

Fanny Loisel*, MSc^{1,2}, Bastien Provost*, MSc¹, Julien Guihaire, MD, PhD^{1,3}, David Boulate MD^{1,3}, Nassim Arouche, Eng², Benoit Decante, MSc¹, Peter Dorfmueller MD PhD^{1,5}, Bruno Baudet BSc⁶, Frederic Secatore BSc⁶, Didier Letourneur, PhD⁷, Elie Fadel, MD, PhD^{1,4}, Georges Uzan, PhD², Olaf Mercier, MD, PhD^{1,6}

¹Inserm UMR-S 999 (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson), ²Inserm U1197 (Paul Brousse Hospital, Villejuif), ³Department of Cardiac Surgery (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson), ⁴Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson), ⁵Department of Pathology (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson), ⁶Surgical Research Lab (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis-Robinson), ⁷Inserm U1148 (Bichat Hospital, Paris).

Introduction

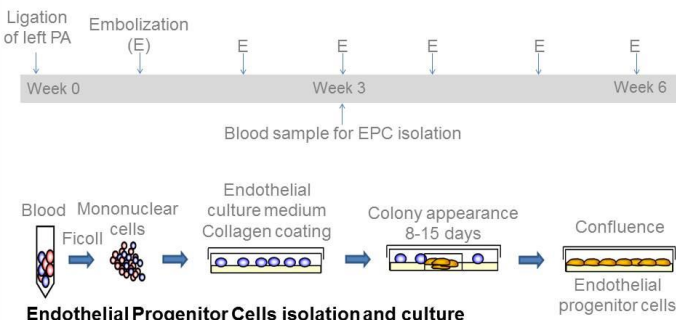
Despite significant advances in its medical management, pulmonary arterial hypertension (PAH) remains a non-curable condition requiring lung or heart and lung transplantation when right ventricular severe dysfunction or failure occur. It is well known that right ventricular function is the main predictor of prognosis in these patients [1]. It has been demonstrated in animal model that when right ventricle (RV) failed there was a discrepancy between the decreased myocardial capillary density and the workload of the RV [2]. Even though mechanisms leading to decreased RV perfusion in PAH have not been entirely elucidated, improvement of capillary density seems to be an interesting target for new PAH-induced RV failure therapies. Endothelial progenitor cells (EPC) are circulating cells which can induce angiogenesis either by participating directly to revascularization by repairing damaged vessels or forming neo-vessels; or through the release of paracrine factors which stimulate vascular repair and regeneration. Hence, these cells may be good candidates for RV cell therapy to prevent PAH induced RV failure. By contrast to left heart disease, stem cell therapy applied to the RV is poorly studied, even though it may be a therapeutic option. That is why in this study we aimed to evaluate the feasibility of different types of EPC delivery to the RV of a chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) piglet model. We choose to study the feasibility of three routes of administration because outcomes of preclinical studies dealing with stem cell therapy for heart disease depend not only on the cell types used but also on the route of administration selected.

Objective

To evaluate the feasibility of different types of Endothelial Progenitor Cells delivery to the right ventricle of a chronic thromboembolic pulmonary hypertension piglet model

Material & methods

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension piglet model



3 CTEPH piglets

- PAPm > 25 mmHg
- RV remodeling
- RV decreased capillary density



Autologous EPC

- ≈ 10 million/piglet
- GFP or CFSE labelled

Right intracoronary delivery

- 8 millions GFP-EPC
- Sacrifice 24h after administration

Intramyocardial delivery

- 10 millions CFSE-EPC
- Sacrifice 24h after administration

Polysaccharide patch

- 13 millions GFP-EPC
- Sacrifice 48h after administration

PA : Pulmonary Artery
PAPm: Pulmonary Artery Pressure mean
EPC: Endothelial Progenitor Cells

Results

Right intracoronary delivery

Right intracoronary delivery of 8 millions of GFP-labelled EPC resuspended in 1 mL of physiologic serum in a CTEPH piglet for 24h.

EPC in RV 24h after intracoronary delivery

Figure 1

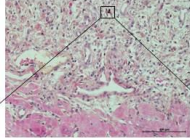
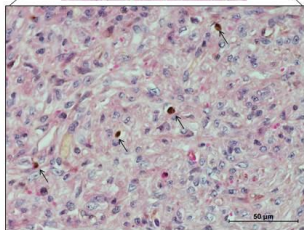


Figure 1 – Anti-GFP staining on HES sections of RV. EPC are found in the epicardium.



EPC in lung 24h after intracoronary delivery

Figure 2

Figure 2 – Anti-GFP staining on HES sections of lung.

After right intracoronary delivery EPC were found in RV epicardium and also in lungs, liver, spleen and kidneys at a lower level.

Intramyocardial delivery

Right ventricular epicardial delivery of 10 millions of CFSE-labelled EPC resuspended in 1 mL of physiologic serum in a CTEPH piglet. Delivery was realized at 4 points on RV free wall. Each point was marked by a stitch in order to localize the area of delivery for histological analyses. We did 10 injections of 25 µL at each point and sacrificed the piglet 24h later.

Figure 3

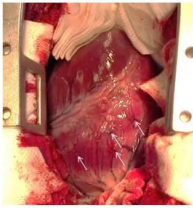


Figure 3 – EPC delivery in RV free wall. Arrows show sites of injections marked by stitches.

Figure 4

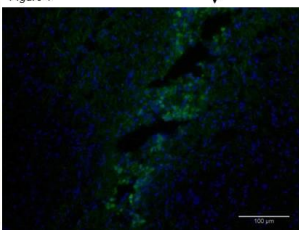


Figure 4 – Immunolabelled section of RV. EPC are in green and nucleus marked by Dapi in blue.

After intramyocardial administration, we found EPC as different clusters at the injection sites localized in RV free wall.

Polysaccharide patch

EPC in patch for 24h and 48h – In vitro observations

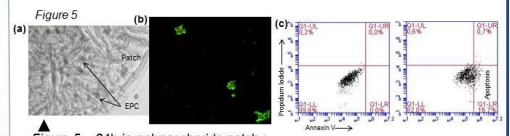
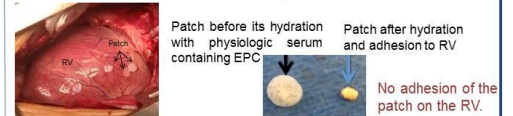


Figure 5 – 24h in polysaccharide patch : (a) EPC gathered in cluster in the patch. (b) EPC viability, calcein (green) and propidium iodide (red) staining. (c) EPC apoptosis, FACS with annexin V and propidium iodide.

48h in patch : (d) EPC apoptosis, FACS with annexin V and propidium iodide.

EPC survive in patch up to 48h.

Patch adhesion on RV – Use of nanoparticles



Patch adhesion on RV – Use of Tachosil®

Patch containing 13 millions EPC placed on the RV of a CTEPH piglet for 48h.

EPC did not migrate from the patch to the RV.

Conclusion & Discussion

In this study, we showed the feasibility of 3 different ways to deliver cells to the RV in a CTEPH animal model. We observed that early cell retention rate was better in intracoronary and intramyocardial delivery compared to the patch delivery. Intracoronary delivery is one of the most practiced technique. Clinical trials already used this route of administration with different cell types and proved it to be safe and effective [4][5]. In our study we saw cells retained in epicardium but also in other organs such as lungs. One of the drawbacks of this technique is that it does not only target the heart. In our study, intramyocardial cell delivery has also been proved to be well tolerated and safe. This route of administration seems to be the most promising concerning cell retention [6]. However, this is a very invasive technique and it may carry the risk of ventricular wall perforation and cardiac arrhythmia. Further improvements are needed for the patch delivery on the RV. Biomaterial approaches to cell delivery have been studied for a few years and a clinical trial already evaluated the feasibility of cell seeded collagen scaffold [7]. Utilization of scaffold for myocardium regeneration has the advantage to provide a sustained delivery of cells over time. In conclusion, the preliminary results of this study are promising for the development of stem cell therapy to sustain RV function in PAH.

Bibliography : [1] Ghio et al. 2001 ; [2] Sutendra et al. 2013 ; [3] Mercier et al. 2013 ; [4] Chugh et al. 2012 ; [5] Schächinger et al. 2009 ; [6] Vrtovec et al. 2013 ; [7] Menasché et al. 2008

Annexe 3 : Poster présenté lors du congrès « International Vascular Biology Meeting » 2018

T115 Endothelial progenitor cells improve right ventricular function in a model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension

Fanny Loiselet, MSc^{1,2}, Bastien Provost, MSc¹, Julien Guihaie, MD, PhD^{1,3}, David Boulate MD^{1,3}, Nassim Arouche, Eng¹, Benoît Decante, MSc¹, Peter Dorfmueller MD PhD^{1,3}, Elie Fadel, MD, PhD^{1,4}, Georges Uzan, PhD⁵, Olaf Mercier, MD, PhD^{1,4}
¹Inserm UMR-S 999 (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson), ²Inserm U1197 (Paul Brousse Hospital, Villejuif), ³Department of Cardiac Surgery (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson), ⁴Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson), ⁵Department of Pathology (Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson)

Introduction

Despite significant advances in its medical management, pulmonary arterial hypertension (PAH) remains a non-curable condition requiring lung or heart and lung transplantation when right ventricular severe dysfunction or failure occur. It is well known that right ventricular function is the main predictor of prognosis in these patients [1]. It has been demonstrated in animal model that when right ventricle (RV) failed there was a discrepancy between the decreased myocardial capillary density and the workload of the RV [2]. Even though mechanisms leading to decreased RV perfusion in PAH have not been entirely elucidated, improvement of capillary density seems to be an interesting target for new PAH-induced RV failure therapies. Endothelial progenitor cells (EPCs) are circulating cells which can induce angiogenesis either by participating directly to revascularization by repairing damaged vessels or forming neo-vessels; or through the release of paracrine factors which stimulate vascular repair and regeneration. Hence, these cells may be good candidates for RV cell therapy to prevent PAH induced RV failure. By contrast to left heart disease, stem cell therapy applied to the RV is poorly studied, even though it may be a therapeutic option. That is why we aimed to determine whether right intracoronary EPC infusion improves RV function and capillary density in a PAH model.

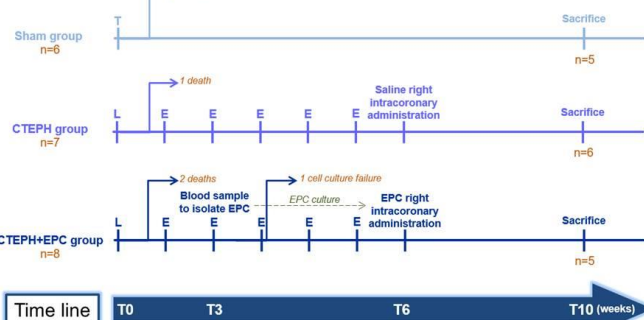
Objective

To determine whether right intracoronary EPC infusion improves right ventricular function and capillary density in a model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension

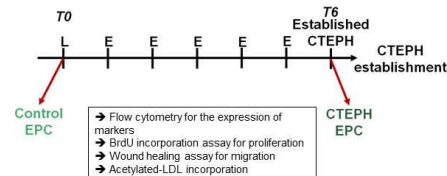
Material & Methods

CTEPH = Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension
 EPC = Endothelial Progenitor Cells

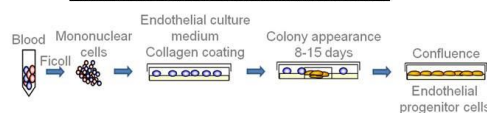
Study design



Study design for the phenotypic and functional comparison of endothelial progenitor cells before and after CTEPH establishment



Endothelial progenitor cells isolation and culture

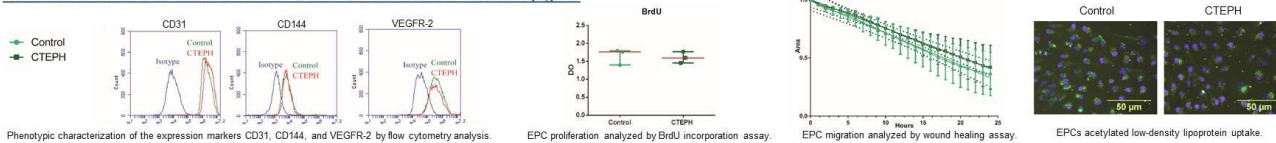


Assessment

- Right heart catheterization
- Echocardiography
- Pressure - Volume loops
- Pathology (capillary density, cardiomyocyte surface area, pulmonary artery media thickness, protein and ARN expression)

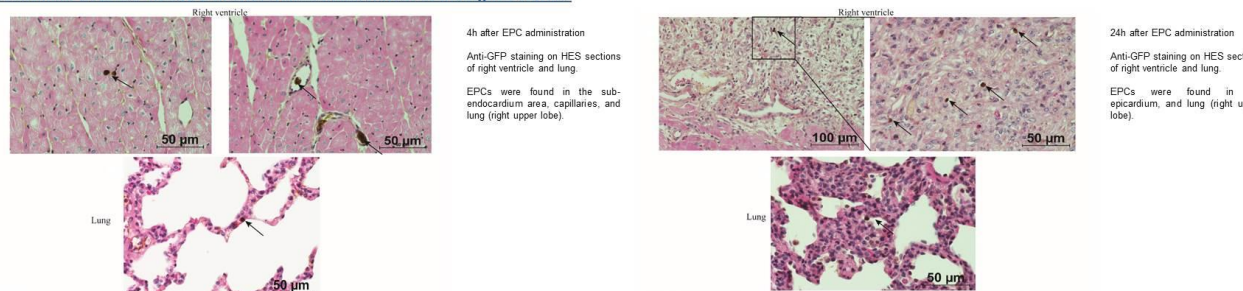
Results

Assessment of EPC function before and after CTEPH establishment in piglets



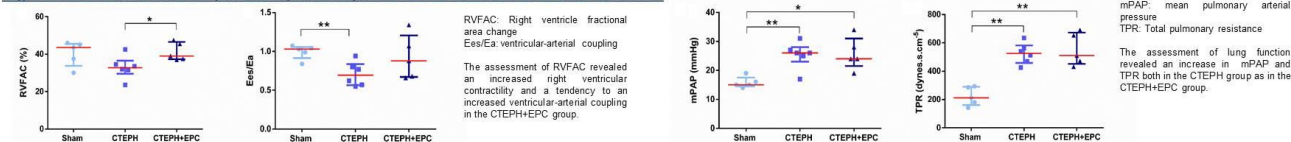
Comparison of EPCs isolated before and after the establishment of CTEPH did not reveal any difference in terms of phenotypic or functional characteristics. Regarding these results, we assumed that the isolation of EPCs during the development of the disease did not impact the efficacy of the EPC therapy.

Localization of EPCs 4h and 24h after their administration in the right ventricle



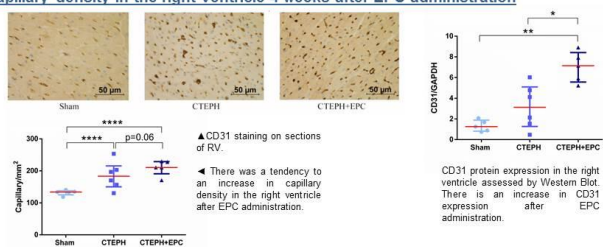
4h and 24h after their administration EPCs were mainly found in the right ventricle and the right upper lobe. However, 4 weeks after their administration EPCs were not found in the right ventricle.

Right ventricle function and pulmonary hemodynamics 4 weeks after EPC administration



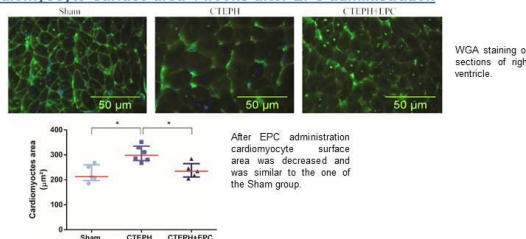
The improvement of right ventricle contractility without any improvement in lung function suggested that EPCs may exert their effect mainly on the right ventricle.

Capillary density in the right ventricle 4 weeks after EPC administration



A tendency for increased capillary density was observed after EPC administration in this CTEPH model.

Cardiomyocyte surface area 4 weeks after EPC administration



Cardiomyocyte surface area is decreased after EPC administration in a CTEPH piglet model. EPCs may participate in the prevention of hypertrophy in this model.

Conclusion & Discussion

Autologous intracoronary injection of EPCs was associated with an improvement in RV systolic function in an animal model of CTEPH [3]. EPCs were present in the RV and lung only 4 h and 24 h following their injection. A reduced cardiomyocyte surface area and a tendency for increased capillary density after EPC administration were also observed. No differences were observed between the CTEPH and the CTEPH+EPC piglets in terms of lung function. Although the mechanistic evidence is limited, our results suggest that EPCs may exert their effect mainly on the RV. We hypothesize that when EPCs are injected intracoronary they pass through the RV for at least the first 24 h, during which they may secrete paracrine factors leading to a decrease in the cardiomyocyte surface area and a minor increase in capillary density that results in an improvement of the RV hemodynamic function. One major limitation of the experimental CTEPH model is the lack of a decrease in the capillary density in the RV that has been observed in other small-animal models or in patients with severe PAH [2,4,5]. Alternatively, the time of EPC administration could be delayed to obtain a higher level of RV dysfunction, thus leading to the capillary rarefaction characteristic of PAH, as observed in the study of Noly et al. [6]. The translation of this cell therapy to clinical studies could be difficult to set in place because of the use of autologous cells. EPCs isolated from cord blood could be an alternative to autologous EPCs. Several studies have shown the superiority of cord blood EPCs over adult EPCs in terms of their proliferative capacity and their ability to create new vessels and to participate in angiogenesis, and their use has already been proposed for several clinical applications [7,8,9].

**Annexe 4 : « Article Soft thermoplastic elastomer for easy and rapid spin-coating fabrication of microfluidic devices with high hydrophilization and bonding performances »
3ème auteur, dans le cadre de la participation au RHU-BioArt Lung 2020.**

Soft Thermoplastic Elastomer for Easy and Rapid Spin-Coating Fabrication of Microfluidic Devices with High Hydrophilization and Bonding Performances

Julie Lachaux, Hugo Salmon, Fanny Loisel, Nassim Arouche, Ignacio Ochoa, Luis L. Fernandez, Georges Uzan, Olaf Mercier, Teodor Veres, and Emmanuel Roy*

Spin-coating process of a commercially available soft thermoplastic elastomer (sTPE) is demonstrated for the realization of microfluidic prototypes. It is a reliable, wrinkling-free, and high-yield holding and transfer methodology for single and multilayered devices fabrication. Complex microfluidic systems including embedded microlenses array, dilutor-like chip for stable capillary filling, and pneumatically drive valve confirms the performances and quality of the process. The dissolved sTPE, a soft styrenic-block polymer-based material, is flexible in its raw state as poly(dimethylsiloxane) and thermoformable as classical thermoplastics. Depending on the solvent evaporation rate, two stable morphologies of the block nanodomains are revealed: either a nanocylinder or hexagonal nanospheres pattern. Both are evenly distributed over the whole surface and account for a uniform and convenient surface at a “microfluidic scale device.” Plasma hydrophilization allows a stable and hydrophilic surface ($\approx 20^\circ$ after 7 d). The biocompatibility is assessed through the cell culture proliferation assay of progenitor endothelial cells. This sTPE solution displays fast and reliable fabrication and assembly performances, it can achieve strong and stable hydrophilicity within a low level of initial equipment investment.

One of the common challenges in the commercialization of microfluidic systems is the mismatch between the prototyping material, favored for accessibility and ease of fabrication, and the industrial material, more appropriate for large-scale manufacturing. For laboratories that focus on development of biochips for biology and medicine, there is a limited range of materials that permits rapid prototyping, with low level of initial equipment investment, and does not require extensive training in material engineering. Most commonly, those few prototyping materials are not adequate for mass production. This issue has been previously highlighted as a real roadblock for biomedical innovation,^[1,2] and for both research and commercialization, the lack of optimized biochip micro-fabrication solutions is a detrimental factor.^[3–5] Indeed, as the main workload in the development of biochips is the protocol validation and data acquisition, few microfluidic research laboratories can afford to

J. Lachaux, Dr. E. Roy
Centre Nanosciences et Nanotechnologies
CNRS UMR9001
Paris-Saclay University
91460 Marcoussis, Paris, France
E-mail: royemmanuel@live.com

Dr H. Salmon
Université Paris Descartes
Sorbonne Paris Cité
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS)
UMR 8258 CNRS
U 1022
Inserm, 75006 Paris, France
F. Loisel, N. Arouche, Dr. G. Uzan
Inserm 1197 Research Unit
Univ. Paris Sud
94807 Villejuif Cedex, Paris-Saclay, France

F. Loisel, Prof. O. Mercier
Research and Innovation Unit
Inserm UMR-S 999
Marie Lannelongue Hospital
Univ. Paris Sud
Paris-Saclay University
F-92350 Le Plessis Robinson, Paris, France
Dr I. Ochoa, Dr L. L. Fernandez
Biomedical Research Networking center in Bioengineering
Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN)
Aragón Institute of Engineering Research (I3A)
IIS Aragon
Group of Applied Mechanics and Bioengineering (AMB)
University of Zaragoza
50009 Zaragoza, Spain
Prof. T. Veres, Dr E. Roy
National Research Council of Canada
75 de Mortagne Boulevard, Boucherville J4B 6Y4, Québec, Canada
Dr E. Roy
Eden Microfluidics SAS
83 Avenue Philippe-Auguste 75011 Paris, France

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/admt.201800308>.

DOI: 10.1002/admt.201800308

1 spend time on optimizing the microfabrication process for later
2 industrial production. Thus, the advent of optimized materials
3 solutions is an area of intense activities.^[6–8]

4 In academia, soft lithography (SL) of poly(dimethylsiloxane)
5 (PDMS) remains favorite for rapid prototyping.^[9,10] Fabrication
6 of microfluidic devices based on PDMS is an easy and robust
7 method, and its simplicity is the key to its success. The famous
8 quote from George Whitesides, Harvard University illustrates
9 this status: “One reason why people like PDMS is that it does
10 not break”. Yet, PDMS is a matter of intense debate, in par-
11 ticular: 1. high mechanical compliance, leading to channel
12 deformation, 2. high evaporation/sorption property and gas
13 permeability, 3. leaching out of uncrosslinked oligomers, and
14 4. its hydrophobic recovery. Moreover, SL does not translate for
15 large-scale manufacturing, as it necessitates several serial and
16 lengthy fabrication steps: mixing, degassing, curing, plasma
17 bonding, and other thermal treatments.

18 For the past 15 years, several thermoplastic polymers
19 have been identified to bridge the gap between prototyping and
20 manufacturing issues in a convenient and seamless fashion,
21 and polycarbonate, polystyrene (PS), and polycyclo-olefin (PCO)
22 are the most common candidates.^[11–14] They fit a wide range
23 of manufacturing process, from injection molding, roll-to-roll
24 to hot-embossing. They are mostly absent of academia because
25 of i) the large initial investments required in equipments,
26 ii) their required training and knowledge, and iii) their solvent-
27 based and/or thermally assisted bonding approaches, incompat-
28 ible with numerous bio-applications.^[15,16]

29 Recently, new materials aiming at reducing the gap
30 between industrial thermoplastics (TP) and academic silicone
31 (i. e. PDMS) transparent and biocompatible soft thermoplastic
32 elastomer (sTPE) materials,^[17] which combines the elastomeric
33 properties of elastomer rubber (e.g., PDMS), and that
34 is compatible with the thermoforming manufacturing techni-
35 ques used for TP were introduced.^[18–22] Using diverse sTPE
36 formulations, several comparative study report fast and highly
37 convenient microfabrication of sTPE biochips (i.e., low pres-
38 Q6 sure and isothermal molding) with SEBS copolymer.^[23–25] Also,
39 as PDMS, sTPE allows performing a conformable contact for
40 easy assembly procedure compared to the mostly inadequate
41 methods implemented for classical TP materials.^[17] Indeed,
42 Q7 Brassard et al.^[20] demonstrated the thermoforming and the
43 free-pressure assembly capability in order to create a through-
44 hole microstructured film of sTPE, and its integration in a
45 3D microfluidic monolithic device for DNA and proteins
46 Q8 immobilization. Recently, a sTPE microfluidic CD system was
47 reported as a completely integrated genomic assay, featuring
48 enzyme reagents storage and DNA polymerase chain reaction-
49 based amplification capabilities.^[23] sTPE were also used to
50 create a material of tunable mechanical properties through the
51 addition of mineral agents.

52 Extending these efforts, we therefore report in this paper
53 an enhanced spin-coating microfabrication technique and a
54 stable hydrophilization of a novel sTPE composition, using
55 new, soft, and clear as PDMS sTPE formulation.^[26] It con-
56 sisted in an ultrafast, easy, and inexpensive molding method
57 of a styrenic-block copolymer (BCP) material dissolved in a
58 solvent system. Several microfluidic systems were fabricated to
59 demonstrate the reliability and the capabilities of the process,

1 patterns including: dense array of micrometer-sized lines, 1
2 curved and intricate microchannels, microlenses integration, 2
3 dilutor-like microchip for capillary filling demonstration. To 3
4 our knowledge, this is the first soft thermoplastic material that 4
5 can be used in a spin-coating microfabrication approach for fast 5
6 fabrication and easy assembly of polymer microdevices, while 6
7 maintaining a high and stable hydrophilicity. To characterize 7
8 the process and the plasma hydrophilization treatment, anal- 8
9 ysis of the surface quality and its nanostructured morphology 9
10 through atomic force microscopy (AFM), contact angle meas- 10
11 urements, optical and electronic microscopy were performed. 11
12 Finally, the process was qualified through the fabrication of a 12
13 multilayered sTPE device enabling pneumatically driven valves 13
14 and a proliferation assay of endothelial progenitor cells (EPCs) 14
15 to assess the biocompatibility. 15

16 The block-copolymers phase distribution controls interac- 16
17 tions between the microstructures, the fluids, and the biological 17
18 environment. We investigated the evolution of this morphology 18
19 and its dependence on the thermal annealing step at the 19
20 postspin-coating procedure with three conditions: 1) as-spin 20
21 after 20 min at room temperature, 2) thermal treatment at 21
22 140 °C for 60', and 3) for 180 s (on a hotplate). Controlling the 22
23 surface quality ascertains that the surface properties could be 23
24 considered as homogenous and stable at a micrometric scale. 24
25 The ethylene/butylene (EB) dominant phase provided both 25
26 elastomeric and adhesive properties for bonding perspectives 26
27 on a large panel of surface.^[17,24,27,28] According to these bonding 27
28 capabilities, and using a thick sTPE material (here Flexdym 28
29 1.15 MPa Young modulus) for handling and assembly pur- 29
30 poses, we established the following eighth steps microfabri- 30
31 cation process flow for the fabrication of single and multilayered 31
32 sTPE microfluidic devices. **Figure 1a** shows the implemented 32
33 procedure for both single layer or multilayer structures, step 33
34 five and seven involving the spin coating of the sTPE solution 34
35 over a microstructured mold.^[29,30] 35

36 Two FlexdymSC material solutions were purchased from 36
37 Eden Microfluidics Inc., (Paris, France) with 10 and 25 wt% 37
38 of solids contents in a proprietary solvent system. **Figure 1b** 38
39 displays the range of thicknesses produced with each concen- 39
40 tration. Thin film thicknesses ranged from 5 μm at 4000 rpm 40
41 to 28 μm at 300 rpm for 10 and 25 wt% solutions, respectively. 41
42 As a block copolymer material with low (<15%) content of PS 42
43 blocks and high content of EB soft blocks, FlexdymSC features 43
44 a thermodynamic incompatibility between blocks inducing 44
45 nanophase structuration. This morphological structure pro- 45
46 vided the basis of the material performance: rigid PS domains 46
47 act as junction points that covalently stabilize the soft polymer 47
48 matrix, while the EB dominant phase offers elastomeric proper- 48
49 ties. Readers can refer to prior art for further comprehensive 49
50 understanding of the styrene's-based sTPE.^[17,24,27] 50

51 As a BCP block copolymer, it exhibited a nanophase separa- 51
52 tion, **Figure 1c** reveals different ordering mechanism, and the 52
53 surfaces gradually get from poorly ordered (a spaghetti-like net- 53
54 work of nanosized PS cylinder for as spin) to an ever more con- 54
55 stituted well-ordered hexagonal nanospheres lattice of ~20 nm for 55
56 each 60 and 180 s thermal treatment achieved at 140 °C. The fast 56
57 Fourier transforms displayed either a circular ring or reflections 57
58 characteristic of a hexagonally packed system that confirms iso- 58
59 tropic pattern uniformity and ordered segregation of the surface. 59

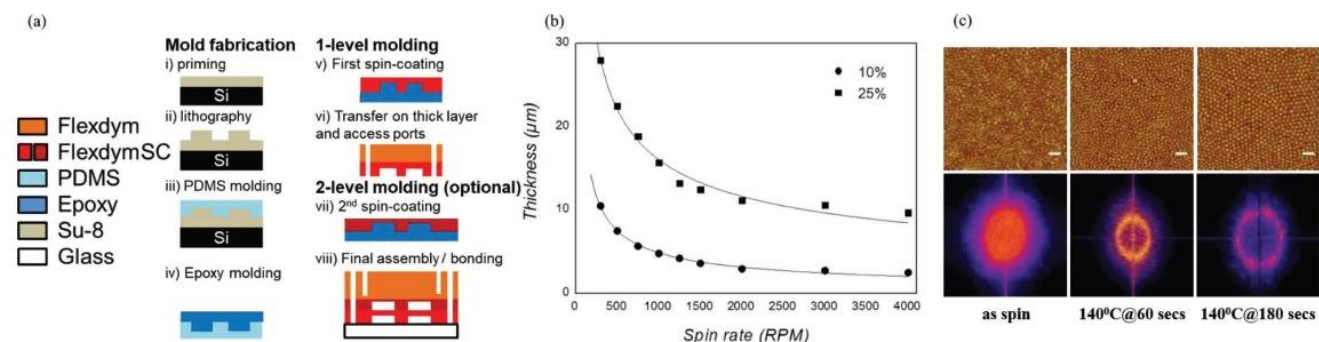


Figure 1. a) Fabrication of FlexdymSC eight steps process flow protocol for the microfabrication, handing, transfer, and bonding of sTPE multilayered microfluidic system. Step vii) is for two-level structures thus optional, in this context for microvalves application only. b) Thin-film thickness in correlation with the spin-coating angular velocity for 10% (circle) and 25% (square) weight solids contents solution. c) Series of $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ contrast phase AFM image for three different solvent evaporation rates, white scale bar is 20 nm. hard PS block polymer components appear bright in a surrounding brown elastomeric ethylene/butylene soft phase, respectively: as-spin (i.e., 20 min at RT), 140 °C for 60 and 140 °C for 180 s. It displays three AFM phase images of $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ area of the molded surface, the bright areas are attributed to the block copolymer component with higher modulus (i.e., PS) surrounded by the brown rubber matrix of ethylene–butylene.^[29,30]

To demonstrate spin-coating molding performances and handling capabilities, series of microstructures were fabricated. Once spin coated, the structured sTPE devices were transferred for further scanning electron microscopy (SEM) and AFM analysis. These demonstrators included a series of various dense patterns featuring different sensitive structural elements, from sharp to round and curved microstructures. Starting from 5 up to 20 μm height structures, patterns replication was validated indistinctly using SU-8 and epoxy molds on a 700 μm thick Flexdym transfer sheet. S1 details in the Supporting Information molds fabrication process as well as a sTPE layer and its mother mold compared profiles in Figure S1 in the Supporting Information.

Static contact angle of deionized (DI) water for the sTPE material (see S4 and Figure S2 in the Supporting Information) reveals the pristine surfaces are hydrophobic and have advancing and receding contact angles of $109 \pm 3^\circ$ and $89 \pm 2^\circ$, respectively. The treatment quality and homogeneity could be indirectly observed over the entire surface area of the large $1'' \times 3''$ sample, all channels being filled of liquids. The roughness of plasma-treated surface increased in the range of 130 up to 240% compared to as-molded surface; however, as qualitatively observed, it had not affected in a visible range the optical clarity of the fabricated system. Because any folds and wrinkled surface were observable in a concomitant manner, due to the robust microfluidic filling, we could assert for a reliable and high-yield method for the transfer, bonding, and assembly of spin-coated microstructured thin film in a multilayered functional microfluidic device.

Figure 2a–h shows SEM images of the test microstructures, exhibiting the quality of the sTPE surfaces that featured no observable defects. All molds were fabricated according to S1 and 2 in the Supporting Information, using SU-8 or epoxy molds showed no significant differences. Structures showed well-defined shapes and excellent surface qualities, (Ra) surface roughness values equal 1.6 and 2.3 nm for SU-8 and epoxy mold, respectively. Figure 2a illustrates the flexibility of elastomer material—supporting major level of deformation (at this stage, higher to 300%), locally highlighted here

by the presence of contamination onto the carrier. It confirms the potential for pneumatically driven valving integration in multilayered configuration and opens the way to rapid and cost-effective approach for microfabrication targeting mechanical and stretchable stimulation on chip. Figure 2b displays the molding performance for a sharp corner definition. Successively and respectively, Figure 2c–f displays 5, 10, 15, and 20 μm height structures. Finally, Figure 2g shows well-ordered and free-defect microlenses fabrication array positioned in a microfluidic cavity.

Taking opportunity of mechanical and bonding (S2, Supporting Information) properties and previously reported stable hydrophilization properties of Flexdym BCP material,^[23] we created a $1600 \mu\text{m}$ thick gradient-like microfluidic generator network $25 \times 75 \text{ mm}^2$, featuring 20 μm deep and 150 μm wide microchannels. Once molded and transferred onto the carrier, the microstructured surface was exposed to oxygen plasma for hydrophilization purpose. Because properties of the sTPE promote a contact occurring spontaneously across the entire surface, a second soft Flexdym was placed onto the plasma exposed surface (total thickness: 1.4 mm). The contact remains reversible, and the sTPE layer can be peeled off and readjusted. The devices are used 2 d after being plasma treated, and colored deionized water was used as a model liquid, and finally injected using a pipette into punched access ports. Figure 2h displays capillary filling demonstration, homogeneous filling, and mechanical flexibility of the trilayers chip. The revealed leakage-free operability contributed to confirm the plasma treatment had not compromised the flexibility of the 25 μm layer and had maintained its structural integrity and viscoelastic properties, allowing for intimate contact and adhesion even after extended and intense plasma exposure (300 W for 5 min). Unlike plasma-treated PDMS, which forms a thin, rather brittle silica layer breaking easily,^[31,32] and due to its hydrophobic recovery, plasma treatment of this BCP material enhances assembly and fluidic performances integrating capillary flow system.

We continued this strategy for achieving a SU-8 mold integrating an array of microlenses array inside a microfluidic

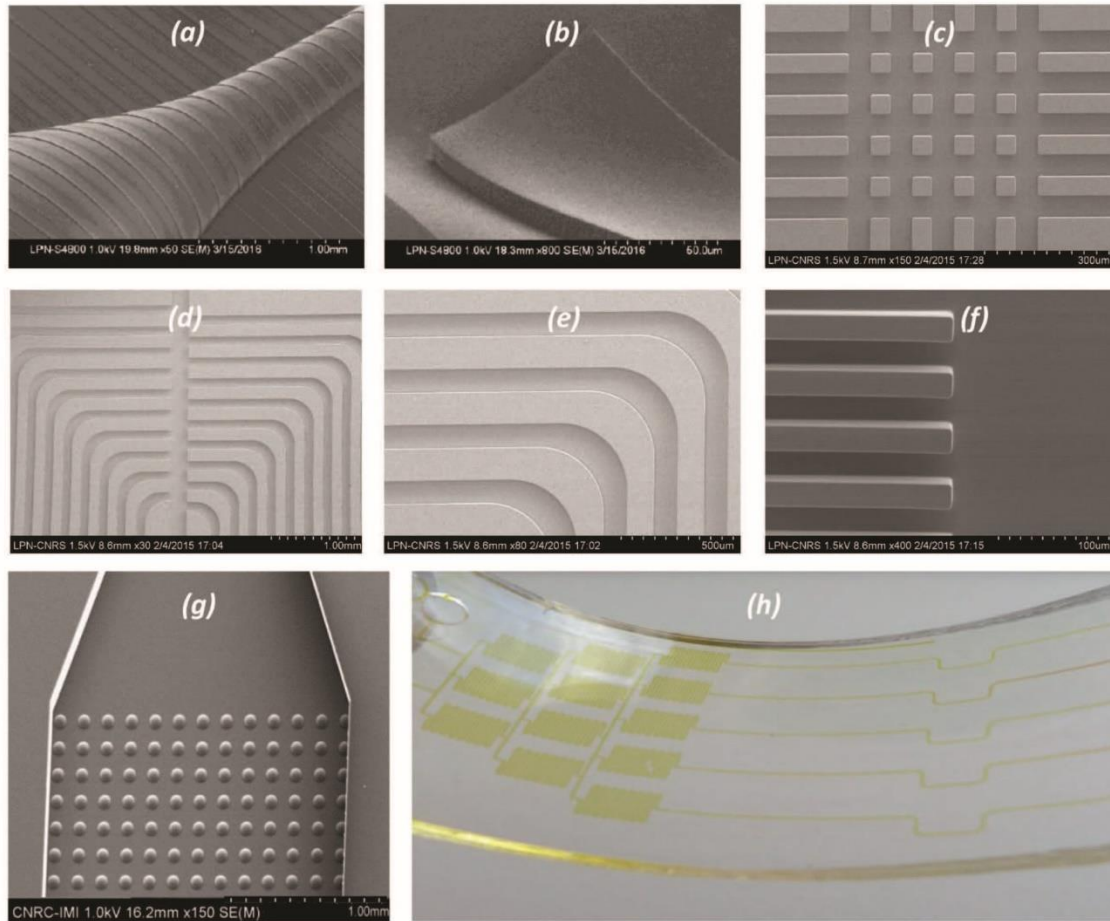


Figure 2. Series of SEM and photograph images illustrating the microstructuration and assembly performance of BCP spin-coated material for various microfluidic devices. a) Array of 100 μm wide channels highly deformed depicting the excellent tear and elastomeric properties. b) Isolated 50 μm wide channel illustrating the excellent replication resolution: corner apex point below 2 μm . c) Dense pattern of $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ square lattice, surrounding by a network of parallel and perpendicular microchannels (structure depth 5 μm). d) Dense and branched network of 100 μm microchannels (structure depth 10 μm). e) Network of 100 μm wide curved channels (structure depth 15 μm). f) 20 μm wide microlines (structure depth 20 μm). g) Microlenses array (75 μm diameter, period 150 μm) integrated inside a microfluidic chamber. h) Gradient-like microfluidic generator network (25 \times 75 mm^2 device) filled with a yellow food colorant for capillary filling investigation.

cavity. Such mold was realized with an additional standard SU-8 lithography step onto the previously described Si/SU-8 wafer featuring the rounded profile. Here, the rounded profile for the microlenses array was initially prepared from a thermal reflow of an array of photoresist SPR 220-7 cylinder pattern (75 μm diameter, and a period of 150 μm).^[33]

Inspired by Quake's configuration for microvalves integration^[34] and following Figure 1b workflow, a multilayered sTPE device featuring a closed microfluidic loop integrating three peristaltic valves was fabricated. The readers can refer to S3 in the Supporting Information for fabrication details. For microfluidic validation, a homemade pneumatic interface was used to apply 0–20 PSI pressure and thus drive fluids. Valves were characterized with a simple observation method: a solution of fluorescein flowing under the membrane was observed with a fluorescent microscope, valves being actuated at different frequencies and pressures. Overall, the “soft” conditions (no harsh temperatures and imprint pressure compared to classical hot embossing lithography) opens new route

for fast and cost-effective mass production for biotechnologies applications as well as for mold material selection to be used. Previously, some materials were excluded from thermal molding due to high imprint pressure: 100 bar for poly(methyl methacrylate) molding^[35] and 10–20 bar for PCO,^[36] inducing epoxy mold deformation of up to 10% after 15 runs.^[12] Compared to hot-embossing lithography, any of the classical molding defects, such as edge damage and asymmetric pull-off of plastics in part due to friction between the polymer and the mold upon de-molding and to thermal expansion issues were found.^[37,38]

Cell-adhesion and proliferation tests were also conducted to confirm the biocompatibility of this new sTPE material. EPCs were seeded at a classical density of 10 000 cells cm^{-2} and observed for 4 d. As assessed by Figure 3a pictures, cells have adhered to sTPE 24 h after seeding. EPCs were also able to proliferate on sTPE for 72 h until reaching confluence 96 h after seeding. sTPE was biocompatible with human primary cells culture and furthermore proliferation and adhesion of EPCs to

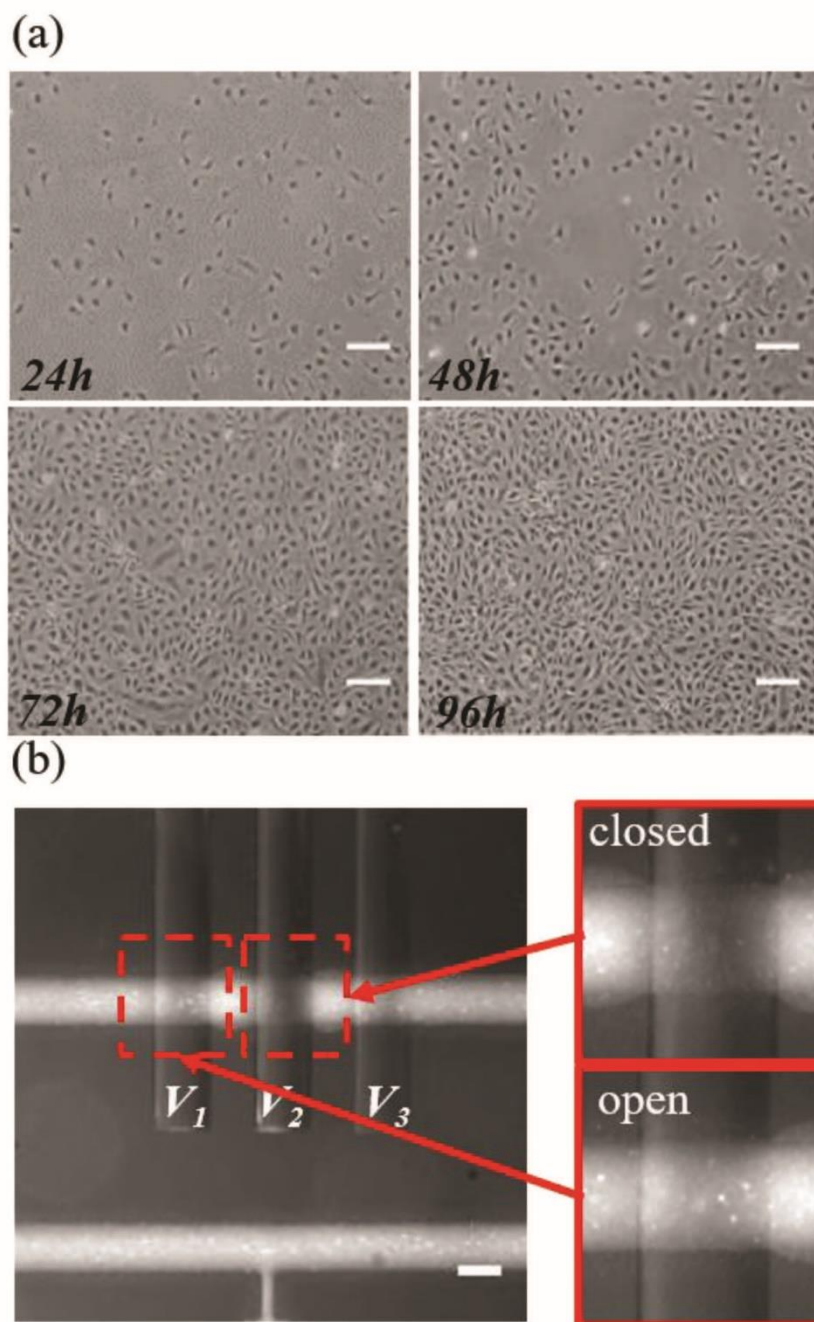


Figure 3. Biocompatibility and applications of spinflex material a) EPC adhesion and proliferation tests on sTPE FlexdymSC material. EPCs were seeded at $10\,000\text{ cells cm}^{-2}$ and observed for 4 d. Scale bar is $40\ \mu\text{m}$. b) Optical microscopic image of multilayered sTPE device with embedded peristaltic micropump; deflection membrane: area = $100 \times 200\ \mu\text{m}^2$, thickness = $\approx 13\text{--}15\ \mu\text{m}$, including on right detailed view of a valve in opened position (opening time 60 ms) and closed position (opening time 90 ms). Scale bar is $100\ \mu\text{m}$.

the sTPE was comparable to that of the PDMS—see S4 in the Supporting Information for further details.

Multilayered microfluidic device with embedded peristaltic micropump is presented in Figure 3b and Movie 1. To achieve a net flow, three valves were positioned in series on a single closed loop channel and operated in a sequential way.^[34] Valves were actuated at 2 Hz with a control pressure of 20 PSI,

measuring 60 and 90 ms for opening and closing time, respectively, corresponding to an upper frequency limit around 6.5 Hz. With a pressure applied onto the flowing channel, the opening time decreased and this limit could be improved. Right pictures illustrate respectively, the opened and closed state of the sTPE deflection membrane. A tiny fluorescent volume remained and the imaged fluorescence signal was minimal for a closed valve, the fluorescence signal was maximal for an open one. It confirmed the elastomeric properties of the used sTPE material, bonding capabilities, and the mechanical performance of the proposed material architecture. Finally, a pumping speed of $1.5\text{--}7.7\ \text{nl}\cdot\text{s}^{-1}$ was successively reached. This asserts for the robust and reliable proposed transfer and bonding process for the multilayered microfluidic fabrication and assembly. It also paves the way for fast prototyping and potentially large fabrication of all thermoplastic-based microfluidic systems at low-cost for a wider and significant opportunities for microfluidic development.

This paper demonstrates a fast and accessible microfabrication technique for advanced microfluidic devices fabrication: a spin-coating molding process conjugated with an easy handling and subsequent enhanced bonding method for single and multilayered microfluidic devices. It does not necessitate cumbersome and expensive equipment, only a master mold, a simple spin-coater, and a hot plate. It represents an important step toward easier, faster, and accessible prototyping. It overcomes some of the current prototyping limitations, and could open opportunities toward microfluidic applications in biomedical research, especially where numerous chips or multilayered system is required. For example, one of the challenge for respiratory research is the creation of an artificial microfluidic lung, requiring hundreds of layers assembly.^[39] Properties of the FlexdymSC material, compared to PDMS, showed comparable biocompatibility, but enhanced and convenient bonding properties. Mechanical flexibility and easiness of assembly are demonstrated with a microfluidic capillary system and a multilayered device embedding peristaltic micropump. For all implemented demonstrators, we have achieved watertight assembly without sophisticated equipments. Optical and SEM images reveal defect-free molding properties using, without any visible damage to the molds. AFM investigations have demonstrated hard PS blocks covalently linked to the EB matrix are evenly arranged on the external polymer surface, creating a homogeneous surface at the “microfluidic scale” and a stable

1 hydrophilized state after plasma treatment. To our knowledge,
2 this is the first thermoplastics elastomer material assembled
3 rapidly and capable of maintaining high and stable hydrophi-
4 licity ($\approx 20^\circ$ after 7 d).

5 In summary, the proposed material enables new opportuni-
6 ties for early prototyping and more specifically, downstream for
7 the development of microdevices for biomedical applications.
8 This easy and accessible fabrication technique, combined with
9 the enhanced properties and stabilities for bonding, assembly,
10 and hydrophilization are acutely well suited for novel micro-
11 fluidic biodevices. FlexdymSC combines the ease and more of
12 prototyping and versatility of PDMS material with downstream
13 thermoforming manufacturing technology commonly used
14 in industry. As such, it bridges the gap currently hindering
15 the translation of research prototypes into commercial prod-
16 ucts. This seamless progression, from very fast prototyping
17 to high-throughput technology, could bring great benefits for
18 microfluidic development and success.

21 Experimental Section

23 Details of microfabrication process are presented in S1 and S2 in the
24 Supporting Information.

25 Layers thicknesses were measured with both AFM and stylus-based
26 profilometry investigations. To ensure the convenient handling, the
27 successive transfer and the bonding of spin-coated sTPE material into
28 multilayered fabricated system, thick sTPE Flexdym foils were used. Foils
29 of 0.8 and 0.3 mm thick (Young modulus 1.15 MPa) were purchased as
30 square sheets of 5" \times 5" (Eden Microfluidics Inc.). These sheets could be
cut with scissors to accommodate any size and stored for later usage.

31 The block-copolymers phase distribution and the surface roughness
32 after molding and hydrophilization experiments were determined
33 by AFM investigations (Veeco Nanoman Dimension V microscope,
34 Veeco, Mannheim, Germany). Both contact and tapping modes were
35 used under ambient conditions with silicon nitride high aspect ratio
36 cantilevers. Characterization experiments were completed with SEM
37 analysis, using S-4800 scanning electron microscope operated at an
acceleration voltage of 1.0–1.5 keV.

38 For hydrophilization of the surfaces, we exposed sTPE surface to
39 oxygen plasma. The treatments were done with an oxygen plasma
40 machine (Nextral NE10, Oerlikon, Pfäffikon, Switzerland) at gas flow
41 of 20 sccm, a pressure of 50 mTorr, for 5 min using different plasma
42 power (100, 200, and 300 W). Static contact angles evolution over time
43 (i.e., 1 week) were measured with a homemade goniometer platform
44 and DI water as the probe liquid. Optical microscopic images were taken
45 using a Nikon Eclipse L150 optical microscope equipped with a QICAM
46 fast digital camera from QImaging Corp.

47 EPCs were isolated from human umbilical cord blood collected
48 after maternal informed consent according to approved institutional
49 guidelines (Hôpital Saint Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
50 Paris, France).

51 Supporting Information

53 Supporting Information is available from the Wiley Online Library or
54 from the author.

57 Acknowledgements

58 The authors thank their colleague Christophe David and Bacern Zribi for
59 technical assistance. E.R. acknowledge Catrene (Cluster for Application

and Technology Research in Europe for Nanoelectronics) and the
French minister of Industry for the financial support of the 3DFF project
(3DFF-CT-213/TSI-020401-2012-18). J.L., F.L., N.A., G.U., O.M., and
E.R. are funded from the French national research agency (ANR) as part
of the second investissements d'avenir program (BioArtlung Project:
ANR-RHUS-0002). I.O. and L.F. are supported by the Spanish national
research program (BIO2016-79092-R, DPI2015-65401-C3-1-R).

Conflict of Interest

E.R. has now created his own company, Eden Microfluidics,
commercializing the Flexdym and FlexdymSC materials on which are
based this research.

Keywords

biomaterials, microfluidics, soft material, spin coating, thermoplastic

Received: July 25, 2018

Revised: October 23, 2018

Published online:

- [1] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. V. Stetten, R. Zengerle, in *Microfluidics Based Microsystems*, Springer, Dordrecht 2010, pp. 305–376.
- [2] P. F. O'Neill, A. Ben Azouz, M. Vázquez, J. Liu, S. Marczak, Z. Slouka, H. C. Chang, D. Diamond, D. Brabazon, *Biomicrofluidics* 2014, 8, 052112.
- [3] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, D. J. Beebe, *Nature* 2014, 507, 181.
- [4] V. Faustino, S. O. Catarino, R. Lima, G. Minas, *J. Biomechanics* 2016, 49, 2280.
- [5] C. M. Klapperich, *Expert Rev. Med. Devices* 2009, 6, 211.
- [6] K. Ren, J. Zhou, H. Wu, *Acc. Chem. Res.* 2013, 46, 2396.
- [7] P. N. Nge, C. I. Rogers, A. T. Woolley, *Chem. Rev.* 2013, 113, 2550.
- [8] A. Alrifai, O. A. Lindahl, K. Rarnser, *Polymers* 2012, 4, 1349.
- [9] E. Kim, Y. Xia, G. M. Whitesides, *Nature* 1995, 376, 581.
- [10] S. K. Sia, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* 2003, 24, 3563.
- [11] D. Ogończyk, J. Węgrzyn, P. Jankowski, B. Dąbrowski, P. Garstecki, *Lab Chip* 2010, 10, 1324.
- [12] E. W. K. Young, E. Berthier, D. J. Guckenberger, E. Sackmann, C. Larners, I. Meyvantsson, A. Huttenlocher, D. J. Beebe, *Anal. Chem.* 2011, 83, 1408.
- [13] P. S. Nunes, P. D. Ohlsson, O. Ordeig, J. P. Kutter, *Microfluid. Nanofluid.* 2010, 9, 145.
- [14] A. B. Azouz, S. Murphy, S. Karazi, M. Vázquez, D. Brabazon, *Mater. Manuf. Processes* 2014, 29, 93.
- [15] C.-W. Tsao, D. L. DeVoe, *Microfluid. Nanofluid.* 2009, 6, 1.
- [16] A. Waldbaur, H. Rapp, K. Länge, B. E. Rapp, *Anal. Methods* 2011, 3, 2681.
- [17] *Thermoplastic Elastomers* (Ed: G. Holden), Hanser Publishers, Hanser/Gardner Publications, Munich, New York, Cincinnati 1996.
- [18] M. D. Borysiak, K. S. Bielawski, N. J. Sniadecki, C. F. Jenkel, B. D. Vogt, J. D. Posner, *Lab Chip* 2013, 13, 2773.
- [19] D. Brassard, L. Clime, K. Li, M. Geissler, C. Miville-Godin, E. Roy, T. Veres, *Lab Chip* 2011, 11, 4099.
- [20] A. Wasay, D. Sameoto, *Lab Chip* 2015, 15, 2749.
- [21] E. Roy, G. Stewart, M. Mounier, L. Malic, R. Peytavi, L. Clime, M. Madou, M. Bossinot, M. G. Bergeron, T. Veres, *Lab Chip* 2015, 15, 406.
- [22] M. D. Guillemette, E. Roy, F. A. Auger, T. Veres, *Acta Biomater.* 2011, 7, 2492.
- [23] E. Roy, M. Geissler, J.-C. Galas, T. Veres, *Microfluid. Nanofluid.* 2011, 11, 235.

- 1 [24] J. Lachaux, C. Alcaine, B. Gómez-Escoda, C. M. Perrault, 1
2 D. O. Duplan, P.-Y. J. Wu, I. Ochoa, L. Fernandez, O. Mercier, 2
3 D. Coudreuse, E. Roy, *Lab Chip* **2017**, *17*, 2581. 3
4 [25] K. Domansky, J. D. Sliz, N. Wen, C. Hinojosa, G. Thompson, 4
5 J. P. Fraser, T. Harnkins-Indik, G. A. Hamilton, D. Levner, 5
6 D. E. Ingber, *Microfluid. Nanofluid.* **2017**, *21*, 107. 6
7 [26] E. Roy, T. Veres, *Microfluidic Device, Composition and Method of* 7
8 *Forming* **2011**, CA2681897A1. 8
9 [27] P. Tordjerman, E. Papon, J.-J. Villenave, *J. Polym. Sci., Part B: Polym.* 9
10 *Phys.* **2000**, *38*, 1201. 10
11 [28] Š. Florián, I. Novák, *J. Mater. Sci.* **2004**, *39*, 649. 11
12 [29] Y. Wang, R. Song, Y. Li, J. Shen, *Surf. Sci.* **2003**, *530*, 136. 12
13 [30] M. Motomatsu, W. Mizutani, H. Tokumoto, *Polymer* **1997**, *38*, 13
14 1779. 14
15 15
16 16
17 17
18 18
19 19
20 20
21 21
22 22
23 23
24 24
25 25
26 26
27 27
28 28
29 29
30 30
31 31
32 32
33 33
34 34
35 35
36 36
37 37
38 38
39 39
40 40
41 41
42 42
43 43
44 44
45 45
46 46
47 47
48 48
49 49
50 50
51 51
52 52
53 53
54 54
55 55
56 56
57 57
58 58
59 59
- [31] S. Béfahy, P. Lipnik, T. Pardoën, C. Nascimento, B. Patris, 1
P. Bertrand, S. Yunus, *Langmuir* **2010**, *26*, 3372. 2
[32] G. Bar, L. Delineau, A. Häfele, M.-H. Whangbo, *Polymer* **2001**, *42*, 3
3627. 4
[33] E. Roy, B. Voisin, J.-F. Gravel, R. Peytavi, D. Boudreau, T. Veres, 5
Microelectron. Eng. **2009**, *86*, 2255. 6
[34] M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S. R. Quake, 7
Science **2000**, *288*, 113. 7
[35] V. Studer, A. Pépin, Y. Chen, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 3614. 8
[36] N. S. Cameron, H. Roberge, T. Veres, S. C. Jakeway, H. J. Crabtree, 9
Lab Chip **2006**, *6*, 936. 9
[37] Y. He, J.-Z. Fu, Z.-C. Chen, *Microsyst. Technol.* **2008**, *14*, 325. 11
[38] M. Worgull, M. Hecke, *Microsyst. Technol.* **2004**, *10*, 432. 12
[39] J. A. Potkay, *Lab Chip* **2014**, *14*, 4122. 13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

Références

- Abdelwahid, Eltyeb, Audrone Kalvelyte, Aurimas Stulpinas, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Luiz Cesar Guarita-Souza, et Gabor Foldes. 2016. « Stem Cell Death and Survival in Heart Regeneration and Repair ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 21 (3): 252-68. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1203-4>.
- Aguero, Jaume, Kiyotake Ishikawa, Lahouaria Hadri, Carlos Santos-Gallego, Kenneth Fish, Nadjib Hammoudi, Antoine Chaanine, et al. 2014. « Characterization of Right Ventricular Remodeling and Failure in a Chronic Pulmonary Hypertension Model ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 307 (8): H1204-1215. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00246.2014>.
- Akita, Takako, Toyooki Murohara, Hisao Ikeda, Ken-Ichiro Sasaki, Toshifumi Shimada, Kimiyasu Egami, et Tsutomu Imaizumi. 2003. « Hypoxic Preconditioning Augments Efficacy of Human Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 83 (1): 65-73.
- Al Maluli, Hayan, Christine M. DeStephan, René J. Alvarez, et Julio Sandoval. 2015. « Atrial Septostomy: A Contemporary Review ». *Clinical Cardiology* 38 (6): 395-400. <https://doi.org/10.1002/clc.22398>.
- Alvarez, Diego F., Lan Huang, Judy A. King, M. Khair ElZarrad, Mervin C. Yoder, et Troy Stevens. 2008. « Lung Microvascular Endothelium Is Enriched with Progenitor Cells That Exhibit Vasculogenic Capacity ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (3): L419-430. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00314.2007>.
- « Anatomie et physiologie: une approche intégrée - Michael P. McKinley, Valerie Dean O'Loughlin, Theresa Stouter Bidle - Google Livres ». s. d. Consulté le 14 août 2018. https://books.google.fr/books/about/Anatomie_et_physiologie.html?id=aRnToQEACA_AJ&redir_esc=y.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, et J. M. Isner. 1997. « Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 275 (5302): 964-67.
- Asosingh, Kewal, et Serpil Erzurum. 2018. « Mechanisms of Right Heart Disease in Pulmonary Hypertension (2017 Grover Conference Series) ». *Pulmonary Circulation* 8 (1): 2045893217753121. <https://doi.org/10.1177/2045893217753121>.
- Atluri, Pavan, Jordan S. Miller, Robert J. Emery, George Hung, Alen Trubelja, Jeffrey E. Cohen, Kelsey Lloyd, et al. 2014. « Tissue-Engineered, Hydrogel-Based Endothelial Progenitor Cell Therapy Robustly Revascularizes Ischemic Myocardium and Preserves Ventricular Function ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 148 (3): 1090-97; discussion 1097-1098. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.06.038>.
- Au, Patrick, Laurence M. Daheron, Dan G. Duda, Kenneth S. Cohen, James A. Tyrrell, Ryan M. Lanning, Dai Fukumura, David T. Scadden, et Rakesh K. Jain. 2008. « Differential in Vivo Potential of Endothelial Progenitor Cells from Human Umbilical Cord Blood and Adult Peripheral Blood to Form Functional Long-Lasting Vessels ». *Blood* 111 (3): 1302-5. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094318>.
- Auger, William R., Jess Mandel, et Joanna Pepke-Zaba. 2016. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. The Journey from a Curiosity to a Cure ». *Annals of the American Thoracic Society* 13 Suppl 3 (juillet): S197-200. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-618AS>.
- Badorff, Cornel, Ralf P. Brandes, Rüdiger Popp, Stefan Rupp, Carmen Urbich, Alexandra Aicher, Ingrid Fleming, Rudi Busse, Andreas M. Zeiher, et Stefanie Dimmeler. 2003. « Transdifferentiation of Blood-Derived Human Adult Endothelial Progenitor Cells into Functionally Active Cardiomyocytes ». *Circulation* 107 (7): 1024-32.
- Badr Eslam, Roza, Kevin Croce, Fernanda Marinho Mangione, Robert Musmann, Jane A. Leopold, Richard N. Mitchell, et Aaron B. Waxman. 2017. « Persistence and Proliferation of Human Mesenchymal Stromal Cells in the Right Ventricular Myocardium after Intracoronary Injection in a Large Animal Model of Pulmonary

- Hypertension ». *Cytotherapy* 19 (6): 668-79.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.002>.
- Barile, Lucio, Vincenzo Lionetti, Elisabetta Cervio, Marco Matteucci, Mihaela Gherghiceanu, Laurentiu M. Popescu, Tiziano Torre, Francesco Siclari, Tiziano Moccetti, et Giuseppe Vassalli. 2014. « Extracellular Vesicles from Human Cardiac Progenitor Cells Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis and Improve Cardiac Function after Myocardial Infarction ». *Cardiovascular Research* 103 (4): 530-41.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvu167>.
- Basile, D. P., J. A. Collett, et M. C. Yoder. 2018. « Endothelial Colony-Forming Cells and pro-Angiogenic Cells: Clarifying Definitions and Their Potential Role in Mitigating Acute Kidney Injury ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 222 (2).
<https://doi.org/10.1111/apha.12914>.
- Basile, David P., et Mervin C. Yoder. 2014. « Circulating and Tissue Resident Endothelial Progenitor Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 229 (1): 10-16.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24423>.
- Bel, Alain, Valérie Planat-Bernard, Atsuhiko Saito, Lionel Bonnevie, Valérie Bellamy, Laurent Sabbah, Linda Bellabas, et al. 2010. « Composite Cell Sheets: A Further Step toward Safe and Effective Myocardial Regeneration by Cardiac Progenitors Derived from Embryonic Stem Cells ». *Circulation* 122 (11 Suppl): S118-123.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927293>.
- Bitzer, Markus, Iddo Z. Ben-Dov, et Thomas Thum. 2012. « Microparticles and MicroRNAs of Endothelial Progenitor Cells Ameliorate Acute Kidney Injury ». *Kidney International* 82 (4): 375-77. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.152>.
- Bogaard, Harm J., Ramesh Natarajan, Scott C. Henderson, Carlin S. Long, Donatas Kraskauskas, Lisa Smithson, Ramzi Ockaili, Joe M. McCord, et Norbert F. Voelkel. 2009. « Chronic Pulmonary Artery Pressure Elevation Is Insufficient to Explain Right Heart Failure ». *Circulation* 120 (20): 1951-60.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.883843>.
- Bompais, Heidi, Jalila Chagraoui, Xavier Canron, Mihaela Crisan, Xu Hui Liu, Aurora Anjo, Carine Tolla-Le Port, et al. 2004. « Human Endothelial Cells Derived from Circulating Progenitors Display Specific Functional Properties Compared with Mature Vessel Wall Endothelial Cells ». *Blood* 103 (7): 2577-84. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2770>.
- Boulate, David, Jennifer Arthur Ataam, Andrew J. Connolly, Genevieve Giraldeau, Myriam Amsallem, Benoit Decante, Lilia Lamrani, et al. 2017. « Early Development of Right Ventricular Ischemic Lesions in a Novel Large Animal Model of Acute Right Heart Failure in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *Journal of Cardiac Failure* 23 (12): 876-86. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2017.08.447>.
- Bradlow, William M., Ravi Assomull, Philip J. Kilner, J. Simon R. Gibbs, Mary N. Sheppard, et Raad H. Mohiaddin. 2010. « Understanding Late Gadolinium Enhancement in Pulmonary Hypertension ». *Circulation. Cardiovascular Imaging* 3 (4): 501-3.
<https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.109.919779>.
- Brittain, Evan L., Anna R. Hemnes, Mary Keebler, Mark Lawson, Benjamin F. Byrd, et Tom DiSalvo. 2012. « Right Ventricular Plasticity and Functional Imaging ». *Pulmonary Circulation* 2 (3): 309-26. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.101407>.
- Bruggen, Cathelijne E. van der, Chris M. Happé, Peter Dorfmueller, Pia Trip, Onno A. Spruijt, Nina Rol, Femke P. Hoevenaars, et al. 2016. « Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2 Mutation in Pulmonary Arterial Hypertension: A View on the Right Ventricle ». *Circulation* 133 (18): 1747-60.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020696>.
- Burlacu, Alexandrina, Gabriela Grigorescu, Ana-Maria Rosca, Mihai Bogdan Preda, et Maya Simionescu. 2013. « Factors Secreted by Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Have Complementary Effects on Angiogenesis in Vitro ». *Stem Cells and Development* 22 (4): 643-53. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0273>.

- Campen, Jasmijn S. J. A. van, Karin de Boer, Mariëlle C. van de Veerdonk, Cathelijne E. E. van der Bruggen, Cor P. Allaart, Pieter G. Raijmakers, Martijn W. Heymans, et al. 2016. « Bisoprolol in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension: An Explorative Study ». *The European Respiratory Journal* 48 (3): 787-96. <https://doi.org/10.1183/13993003.00090-2016>.
- Campian, Maria E., Maxim Hardziyenka, Kora de Bruin, Berthe L. F. van Eck-Smit, Jacques M. T. de Bakker, Hein J. Verberne, et Hanno L. Tan. 2010. « Early Inflammatory Response during the Development of Right Ventricular Heart Failure in a Rat Model ». *European Journal of Heart Failure* 12 (7): 653-58. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfq066>.
- Cantero Peral, Susana, Harold M. Burkhart, Saji Oommen, Satsuki Yamada, Scott L. Nyberg, Xing Li, Patrick W. O'Leary, et al. 2015. « Safety and Feasibility for Pediatric Cardiac Regeneration Using Epicardial Delivery of Autologous Umbilical Cord Blood-Derived Mononuclear Cells Established in a Porcine Model System ». *Stem Cells Translational Medicine* 4 (2): 195-206. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0195>.
- Cao, Ying, Zhao Sun, Lianming Liao, Yan Meng, Qin Han, et Robert Chunhua Zhao. 2005. « Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Differentiate into Endothelial Cells in Vitro and Improve Postnatal Neovascularization in Vivo ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (2): 370-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.135>.
- Castro-Manrreza, Marta E., et Juan J. Montesinos. 2015. « Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications ». *Journal of Immunology Research* 2015: 394917. <https://doi.org/10.1155/2015/394917>.
- Chachques, Juan C., Jorge C. Trainini, Noemi Lago, Miguel Cortes-Morichetti, Olivier Schussler, et Alain Carpentier. 2008. « Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM Trial): Clinical Feasibility Study ». *The Annals of Thoracic Surgery* 85 (3): 901-8. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2007.10.052>.
- Chen, Carol W., Leo L. Wang, Samir Zaman, Jon Gordon, Maria F. Arisi, Chantel M. Venkataraman, Jennifer J. Chung, et al. 2018. « Sustained Release of Endothelial Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles from Shear-Thinning Hydrogels Improves Angiogenesis and Promotes Function after Myocardial Infarction ». *Cardiovascular Research* 114 (7): 1029-40. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy067>.
- Chugh, Atul R., Garth M. Beache, John H. Loughran, Nathan Mewton, Julius B. Elmore, Jan Kajstura, Patroklos Pappas, et al. 2012. « Administration of Cardiac Stem Cells in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: The SCPIO Trial: Surgical Aspects and Interim Analysis of Myocardial Function and Viability by Magnetic Resonance ». *Circulation* 126 (11 Suppl 1): S54-64. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.092627>.
- Condorelli, G., U. Borello, L. De Angelis, M. Latronico, D. Sirabella, M. Coletta, R. Galli, et al. 2001. « Cardiomyocytes Induce Endothelial Cells to Trans-Differentiate into Cardiac Muscle: Implications for Myocardium Regeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19): 10733-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.191217898>.
- Critser, Paul J., et Mervin C. Yoder. 2010. « Endothelial Colony-Forming Cell Role in Neoangiogenesis and Tissue Repair ». *Current Opinion in Organ Transplantation* 15 (1): 68-72. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32833454b5>.
- Crystal, George J., et Paul S. Pagel. 2018. « Right Ventricular Perfusion: Physiology and Clinical Implications ». *Anesthesiology* 128 (1): 202-18. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001891>.
- D'Armini, Andrea M., Marco Morsolini, Gabriella Mattiucci, Valentina Grazioli, Maurizio Pin, Antonio Sciortino, Eloisa Arbustini, Claudio Goggi, et Mario Viganò. 2016. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: From Transplantation to Distal Pulmonary Endarterectomy ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official*

- Publication of the International Society for Heart Transplantation* 35 (6): 827-31.
<https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.12.029>.
- D'Armini, Andrea M., Marco Morsolini, Gabriella Mattiucci, Valentina Grazioli, Maurizio Pin, Adele Valentini, Giuseppe Silvaggio, Catherine Klersy, et Roberto Dore. 2014. « Pulmonary Endarterectomy for Distal Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 148 (3): 1005-11; 1012.e1-2; discussion 1011-1012.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.06.052>.
- Davies, Ben, Ngaire J. Elwood, Shan Li, Fiona Cullinane, Glenn A. Edwards, Donald F. Newgreen, et Christian P. Brizard. 2010. « Human Cord Blood Stem Cells Enhance Neonatal Right Ventricular Function in an Ovine Model of Right Ventricular Training ». *The Annals of Thoracic Surgery* 89 (2): 585-93, 593.e1-4.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.10.035>.
- Dib, Nabil, Harris Khawaja, Samantha Varner, Megan McCarthy, et Ann Campbell. 2011. « Cell Therapy for Cardiovascular Disease: A Comparison of Methods of Delivery ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 4 (2): 177-81.
<https://doi.org/10.1007/s12265-010-9253-z>.
- Dib, Nabil, Robert E. Michler, Francis D. Pagani, Susan Wright, Dean J. Kereiakes, Rose Lengerich, Philip Binkley, et al. 2005. « Safety and Feasibility of Autologous Myoblast Transplantation in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: Four-Year Follow-Up ». *Circulation* 112 (12): 1748-55.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.547810>.
- Diller, Gerhard-Paul, Sven van Eijl, Darlington O. Okonko, Luke S. Howard, Omar Ali, Thomas Thum, Stephen J. Wort, et al. 2008. « Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Eisenmenger Syndrome and Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 117 (23): 3020-30.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769646>.
- Doyle, Brendan, Paul Sorajja, Brian Hynes, Arun H. S. Kumar, Phillip A. Araoz, Paul G. Stalboerger, Dylan Miller, et al. 2008. « Progenitor Cell Therapy in a Porcine Acute Myocardial Infarction Model Induces Cardiac Hypertrophy, Mediated by Paracrine Secretion of Cardiotrophic Factors Including TGFbeta1 ». *Stem Cells and Development* 17 (5): 941-51. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0214>.
- Egemnazarov, Bakytbek, Slaven Crnkovic, Bence M. Nagy, Horst Olschewski, et Grazyna Kwapiszewska. 2018. « Right Ventricular Fibrosis and Dysfunction: Actual Concepts and Common Misconceptions ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 68-69 (août): 507-21. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.010>.
- Fang, Yong-Hu, Lin Piao, Zhigang Hong, Peter T. Toth, Glenn Marsboom, Peter Bache-Wiig, Jalees Rehman, et Stephen L. Archer. 2012. « Therapeutic Inhibition of Fatty Acid Oxidation in Right Ventricular Hypertrophy: Exploiting Randle's Cycle ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 90 (1): 31-43. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0804-9>.
- Farha, Samar, Didem Saygin, Margaret M. Park, Hoi I. Cheong, Kewal Asosingh, Suzy Aa Comhair, Olivia R. Stephens, et al. 2017. « Pulmonary Arterial Hypertension Treatment with Carvedilol for Heart Failure: A Randomized Controlled Trial ». *JCI Insight* 2 (16). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95240>.
- Feinstein, J. A., S. Z. Goldhaber, J. E. Lock, S. M. Ferndandes, et M. J. Landzberg. 2001. « Balloon Pulmonary Angioplasty for Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 103 (1): 10-13.
- Fernández Vallone, V. B., M. A. Romaniuk, H. Choi, V. Labovsky, J. Otaegui, et N. A. Chasseing. 2013. « Mesenchymal Stem Cells and Their Use in Therapy: What Has Been Achieved? » *Differentiation; Research in Biological Diversity* 85 (1-2): 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.08.004>.
- Ferratge, Ségolène, Guillaume Ha, Gilles Carpentier, Nassim Arouche, Rümeyza Bascetin, Laurent Muller, Stéphane Germain, et Georges Uzan. 2017. « Initial Clonogenic Potential of Human Endothelial Progenitor Cells Is Predictive of Their Further

- Properties and Establishes a Functional Hierarchy Related to Immaturity ». *Stem Cell Research* 21: 148-59. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.04.009>.
- Freed, Benjamin H., Mardi Gomberg-Maitland, Sonal Chandra, Victor Mor-Avi, Stuart Rich, Stephen L. Archer, E. Bruce Jamison, Roberto M. Lang, et Amit R. Patel. 2012. « Late Gadolinium Enhancement Cardiovascular Magnetic Resonance Predicts Clinical Worsening in Patients with Pulmonary Hypertension ». *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 14 (février): 11. <https://doi.org/10.1186/1532-429X-14-11>.
- Fuss, Ivan J., Marjorie E. Kanof, Phillip D. Smith, et Heddy Zola. 2009. « Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood ». *Current Protocols in Immunology* Chapter 7 (avril): Unit7.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85>.
- Gaffey, Ann C., Minna H. Chen, Chantel M. Venkataraman, Alen Trubelja, Christopher B. Rodell, Patrick V. Dinh, George Hung, et al. 2015. « Injectable Shear-Thinning Hydrogels Used to Deliver Endothelial Progenitor Cells, Enhance Cell Engraftment, and Improve Ischemic Myocardium ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 150 (5): 1268-76. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.07.035>.
- Galiè, Nazzareno, Marc Humbert, Jean-Luc Vachiery, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki, Gérald Simonneau, et al. 2016. « 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* 37 (1): 67-119. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv317>.
- Ghio, S., A. Gavazzi, C. Campana, C. Inserra, C. Klersy, R. Sebastiani, E. Arbustini, F. Recusani, et L. Tavazzi. 2001. « Independent and Additive Prognostic Value of Right Ventricular Systolic Function and Pulmonary Artery Pressure in Patients with Chronic Heart Failure ». *Journal of the American College of Cardiology* 37 (1): 183-88.
- Giusca, Sorin, Ruxandra Jurcut, Ioan Mircea Coman, Ioana Ghiorghiu, Daniela Catrina, Bogdan A. Popescu, Laura Dima, et Carmen Ginhina. 2013. « Right Ventricular Function Predicts Clinical Response to Specific Vasodilator Therapy in Patients with Pulmonary Hypertension ». *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 30 (1): 17-26. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2012.01809.x>.
- Golpanian, Samuel, Ivonne H. Schulman, Ray F. Ebert, Alan W. Heldman, Darcy L. DiFede, Phillip C. Yang, Joseph C. Wu, et al. 2016. « Concise Review: Review and Perspective of Cell Dosage and Routes of Administration From Preclinical and Clinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease ». *Stem Cells Translational Medicine* 5 (2): 186-91. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0101>.
- Gómez, A., D. Bialostozky, A. Zajarias, E. Santos, A. Palomar, M. L. Martínez, et J. Sandoval. 2001. « Right Ventricular Ischemia in Patients with Primary Pulmonary Hypertension ». *Journal of the American College of Cardiology* 38 (4): 1137-42.
- Gomez-Arroyo, Jose, Luis E. Santos-Martinez, Alberto Aranda, Tomas Pulido, Miguel Beltran, Luis Muñoz-Castellanos, Erick Dominguez-Cano, Chiara Sonnino, Norbert F. Voelkel, et Julio Sandoval. 2014. « Differences in Right Ventricular Remodeling Secondary to Pressure Overload in Patients with Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189 (5): 603-6. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1711LE>.
- Gorter, Thomas M., Erik A. M. Verschuuren, Dirk J. van Veldhuisen, Elke S. Hoendermis, Michiel E. Erasmus, Harm J. Bogaard, Anton Vonk Noordegraaf, Rolf M. F. Berger, Joost P. van Melle, et Tineke P. Willems. 2017. « Right Ventricular Recovery after Bilateral Lung Transplantation for Pulmonary Arterial Hypertension† ». *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 24 (6): 890-97. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivx025>.

- Graham, Brian B., Dan Koyanagi, Balasubramaniam Kandasamy, et Rubin M. Tuder. 2017. « Right Ventricle Vasculature in Human Pulmonary Hypertension Assessed by Stereology ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 196 (8): 1075-77. <https://doi.org/10.1164/rccm.201702-0425LE>.
- Graham, Brian B., Rahul Kumar, Claudia Mickael, Biruk Kassa, Dan Koyanagi, Linda Sanders, Li Zhang, et al. 2018. « Vascular Adaptation of the Right Ventricle in Experimental Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, mai. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0095OC>.
- Granton, John, David Langleben, Michael B. Kutryk, Nancy Camack, Jacques Galipeau, David W. Courtman, et Duncan J. Stewart. 2015. « Endothelial NO-Synthase Gene-Enhanced Progenitor Cell Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: The PHACeT Trial ». *Circulation Research* 117 (7): 645-54. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.305951>.
- Gray, G. A., I. S. Toor, Rfp Castellan, M. Crisan, et M. Meloni. 2018. « Resident Cells of the Myocardium: More than Spectators in Cardiac Injury, Repair and Regeneration ». *Current Opinion in Physiology* 1 (février): 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2017.08.001>.
- Gruh, Ina, Janina Beilner, Ulrike Blomer, Andreas Schmiedl, Ingrid Schmidt-Richter, Marie-Luise Kruse, Axel Haverich, et Ulrich Martin. 2006. « No Evidence of Transdifferentiation of Human Endothelial Progenitor Cells into Cardiomyocytes after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes ». *Circulation* 113 (10): 1326-34. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.559005>.
- Gu, Shenhong, Wei Zhang, Ji Chen, Ruilian Ma, Xiang Xiao, Xiaotang Ma, Zhen Yao, et Yanfang Chen. 2014. « EPC-Derived Microvesicles Protect Cardiomyocytes from Ang II-Induced Hypertrophy and Apoptosis ». *PLoS One* 9 (1): e85396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085396>.
- Guihaire, Julien, François Haddad, David Boulate, André Capderou, Benoît Decante, Erwan Flécher, Saadia Eddahibi, et al. 2014. « Right Ventricular Plasticity in a Porcine Model of Chronic Pressure Overload ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 33 (2): 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.10.026>.
- Guihaire, Julien, Pierre Emmanuel Noly, Sonja Schrepfer, et Olaf Mercier. 2015. « Advancing Knowledge of Right Ventricular Pathophysiology in Chronic Pressure Overload: Insights from Experimental Studies ». *Archives of Cardiovascular Diseases* 108 (10): 519-29. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2015.05.008>.
- Haddad, François, Sharon A. Hunt, David N. Rosenthal, et Daniel J. Murphy. 2008. « Right Ventricular Function in Cardiovascular Disease, Part I: Anatomy, Physiology, Aging, and Functional Assessment of the Right Ventricle ». *Circulation* 117 (11): 1436-48. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.653576>.
- Hamdi, Hadhami, Valérie Planat-Benard, Alain Bel, Etienne Puymirat, Raghed Geha, Laetitia Pidial, Hany Nematalla, et al. 2011. « Epicardial Adipose Stem Cell Sheets Results in Greater Post-Infarction Survival than Intramyocardial Injections ». *Cardiovascular Research* 91 (3): 483-91. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr099>.
- Handoko, M. L., F. S. de Man, C. M. Happé, I. Schalij, R. J. P. Musters, N. Westerhof, P. E. Postmus, W. J. Paulus, W. J. van der Laarse, et A. Vonk-Noordegraaf. 2009. « Opposite Effects of Training in Rats with Stable and Progressive Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 120 (1): 42-49. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.829713>.
- Handoko, M. Louis, Regis R. Lamberts, Everaldo M. Redout, Frances S. de Man, Christa Boer, Warner S. Simonides, Walter J. Paulus, Nico Westerhof, Cornelis P. Allaart, et Anton Vonk-Noordegraaf. 2009. « Right Ventricular Pacing Improves Right Heart Function in Experimental Pulmonary Arterial Hypertension: A Study in the Isolated Heart ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297 (5): H1752-1759. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00555.2009>.

- Hardziyenka, Maxim, Sulaiman Surie, Joris R. de Groot, H. A. C. M. Rianne de Bruin-Bon, Reinoud E. Knops, Maurice Rimmelink, Ze-Yie Yong, et al. 2011. « Right Ventricular Pacing Improves Haemodynamics in Right Ventricular Failure from Pressure Overload: An Open Observational Proof-of-Principle Study in Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology* 13 (12): 1753-59. <https://doi.org/10.1093/europace/eur189>.
- Hare, Joshua M., Joel E. Fishman, Gary Gerstenblith, Darcy L. DiFede Velazquez, Juan P. Zambrano, Viky Y. Suncion, Melissa Tracy, et al. 2012. « Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: The POSEIDON Randomized Trial ». *JAMA* 308 (22): 2369-79. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.25321>.
- Harrison, Alexis, Nathan Hatton, et John J. Ryan. 2015. « The Right Ventricle under Pressure: Evaluating the Adaptive and Maladaptive Changes in the Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension Using Echocardiography (2013 Grover Conference Series) ». *Pulmonary Circulation* 5 (1): 29-47. <https://doi.org/10.1086/679699>.
- Hass, Ralf, Cornelia Kasper, Stefanie Böhm, et Roland Jacobs. 2011. « Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC ». *Cell Communication and Signaling: CCS* 9 (mai): 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>.
- Hoeper, Marius M. 2015. « Pharmacological Therapy for Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 24 (136): 272-82. <https://doi.org/10.1183/16000617.00001015>.
- Hofmann, Michael, Kai C. Wollert, Gerd P. Meyer, Alix Menke, Lubomir Arseniev, Bernd Hertenstein, Arnold Ganser, Wolfram H. Knapp, et Helmut Drexler. 2005. « Monitoring of Bone Marrow Cell Homing into the Infarcted Human Myocardium ». *Circulation* 111 (17): 2198-2202. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000163546.27639.AA>.
- Hou, Dongming, Eyas Al-Shaykh Youssef, Todd J. Brinton, Ping Zhang, Pamela Rogers, Erik T. Price, Alan C. Yeung, Brian H. Johnstone, Paul G. Yock, et Keith L. March. 2005. « Radiolabeled Cell Distribution after Intramyocardial, Intracoronary, and Interstitial Retrograde Coronary Venous Delivery: Implications for Current Clinical Trials ». *Circulation* 112 (9 Suppl): I150-156. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.526749>.
- Hu, Cheng-Heng, Zhi-Ming Li, Zhi-Min Du, Ai-Xia Zhang, Jamal S. Rana, Dong-Hong Liu, Da-Ya Yang, et Gui-Fu Wu. 2010. « Expanded Human Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells Salvage Infarcted Myocardium in Rats with Acute Myocardial Infarction ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 37 (5-6): 551-56. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05347.x>.
- Huang, Zheyong, Chenguang Li, Shan Yang, Jianfeng Xu, Yunli Shen, Xinxing Xie, Yuxiang Dai, et al. 2015. « Magnetic Resonance Hypointensive Signal Primarily Originates from Extracellular Iron Particles in the Long-Term Tracking of Mesenchymal Stem Cells Transplanted in the Infarcted Myocardium ». *International Journal of Nanomedicine* 10: 1679-90. <https://doi.org/10.2147/IJN.S77858>.
- Hunt, Charles J. 2011. « Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review ». *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie* 38 (2): 107-23. <https://doi.org/10.1159/000326623>.
- Hynes, Brian, Arun H. S. Kumar, John O'Sullivan, Chirlei Klein Buneker, Anne-Laure Leblond, Sharon Weiss, Jeffrey Schmeckpeper, Kenneth Martin, et Noel M. Caplice. 2013. « Potent Endothelial Progenitor Cell-Conditioned Media-Related Anti-Apoptotic, Cardirotrophic, and pro-Angiogenic Effects Post-Myocardial Infarction Are Mediated by

- Insulin-like Growth Factor-1 ». *European Heart Journal* 34 (10): 782-89.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr435>.
- Ingram, David A., Laura E. Mead, Daniel B. Moore, Wayne Woodard, Amy Fenoglio, et Mervin C. Yoder. 2005. « Vessel Wall-Derived Endothelial Cells Rapidly Proliferate Because They Contain a Complete Hierarchy of Endothelial Progenitor Cells ». *Blood* 105 (7): 2783-86. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3057>.
- Ingram, David A., Laura E. Mead, Hiromi Tanaka, Virginia Meade, Amy Fenoglio, Kelly Mortell, Karen Pollok, Michael J. Ferkowicz, David Gilley, et Mervin C. Yoder. 2004. « Identification of a Novel Hierarchy of Endothelial Progenitor Cells Using Human Peripheral and Umbilical Cord Blood ». *Blood* 104 (9): 2752-60.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1396>.
- Jaïs, Xavier, Andrea M. D'Armini, Pavel Jansa, Adam Torbicki, Marion Delcroix, Hossein A. Ghofrani, Marius M. Hoeper, et al. 2008. « Bosentan for Treatment of Inoperable Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: BENEFiT (Bosentan Effects in INopERable Forms of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension), a Randomized, Placebo-Controlled Trial ». *Journal of the American College of Cardiology* 52 (25): 2127-34. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.08.059>.
- Jensen, Kurt W., Kim M. Kerr, Peter F. Fedullo, Nick Hyong Kim, Victor J. Test, Ori Ben-Yehuda, et William R. Auger. 2009. « Pulmonary Hypertensive Medical Therapy in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension before Pulmonary Thromboendarterectomy ». *Circulation* 120 (13): 1248-54.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.865881>.
- Junhui, Zhu, Wang Xingxiang, Fu Guosheng, Shang Yunpeng, Zhang Furong, et Chen Junzhu. 2008a. « Reduced Number and Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *Respiratory Medicine* 102 (7): 1073-79. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.12.030>.
- . 2008b. « Reduced Number and Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *Respiratory Medicine* 102 (7): 1073-79. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.12.030>.
- Jutant, Etienne-Marie, et Marc Humbert. 2016. « [Pulmonary hypertension: definition, classification and treatments] ». *Biologie Aujourd'hui* 210 (2): 53-64.
<https://doi.org/10.1051/jbio/2016014>.
- Kang, Hyunsook, Kang-Hyun Kim, Jisun Lim, You-Sun Kim, Jinbeom Heo, Jongjin Choi, Jaeho Jeong, et al. 2015. « The Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Primed with Sphingosine-1 Phosphate on Pulmonary Artery Hypertension ». *Stem Cells and Development* 24 (14): 1658-71.
<https://doi.org/10.1089/scd.2014.0496>.
- Kanki-Horimoto, Sachiko, Hitoshi Horimoto, Shigetoshi Mieno, Kenji Kishida, Fusao Watanabe, Eisuke Furuya, et Takahiro Katsumata. 2006. « Implantation of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase Improves Right Ventricular Impairments Caused by Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 114 (1 Suppl): I181-185.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001487>.
- Kawamoto, Atsuhiko, Tengis Tkebuchava, Jun-Ichi Yamaguchi, Hiromi Nishimura, Young-Sup Yoon, Charles Milliken, Shigeki Uchida, et al. 2003. « Intramyocardial Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization of Myocardial Ischemia ». *Circulation* 107 (3): 461-68.
- Kervadec, Anaïs, Valérie Bellamy, Nadia El Harane, Lousineh Arakélian, Valérie Vanneaux, Isabelle Cacciapuoti, Hany Nemetalla, et al. 2016. « Cardiovascular Progenitor-Derived Extracellular Vesicles Recapitulate the Beneficial Effects of Their Parent Cells in the Treatment of Chronic Heart Failure ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 35 (6): 795-807. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.01.013>.
- Kim, Nick H., et Gérald Simonneau. 2016. « Future Directions in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. Disease at a Crossroads? » *Annals of the American*

- Thoracic Society* 13 Suppl 3 (juillet): S255-258.
<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201601-065AS>.
- Kobayashi, Hiroshi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Kayoko Tono, Haruchika Masuda, Takayuki Asahara, Hiroshi Kasanuki, et Teruo Okano. 2008. « Fibroblast Sheets Co-Cultured with Endothelial Progenitor Cells Improve Cardiac Function of Infarcted Hearts ». *Journal of Artificial Organs: The Official Journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 11 (3): 141-47. <https://doi.org/10.1007/s10047-008-0421-8>.
- Kolb, Todd M., Jacelyn Peabody, Philip Baddoura, Jon Fallica, Jason R. Mock, Benjamin D. Singer, Franco R. D'Alessio, Mahendra Damarla, Rachel L. Damico, et Paul M. Hassoun. 2015. « Right Ventricular Angiogenesis Is an Early Adaptive Response to Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension ». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 22 (8): 724-36. <https://doi.org/10.1111/micc.12247>.
- Konstam, Marvin A., Michael S. Kiernan, Daniel Bernstein, Biykem Bozkurt, Miriam Jacob, Navin K. Kapur, Robb D. Kociol, et al. 2018. « Evaluation and Management of Right-Sided Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association ». *Circulation* 137 (20): e578-622. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000560>.
- Koyanagi, Masamichi, Carmen Urbich, Emmanouil Chavakis, Jörg Hoffmann, Stefan Rupp, Cornel Badorff, Andreas M. Zeiher, Anna Starzinski-Powitz, Judith Haendeler, et Stefanie Dimmeler. 2005. « Differentiation of Circulating Endothelial Progenitor Cells to a Cardiomyogenic Phenotype Depends on E-Cadherin ». *FEBS Letters* 579 (27): 6060-66. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.071>.
- Laarse, Arnoud van der, Christa M. Cobbaert, et Soban Umar. 2015. « Stem and Progenitor Cell Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: Effects on the Right Ventricle (2013 Grover Conference Series) ». *Pulmonary Circulation* 5 (1): 73-80. <https://doi.org/10.1086/679701>.
- Lai, Yen-Chun, Karin C. Potoka, Hunter C. Champion, Ana L. Mora, et Mark T. Gladwin. 2014. « Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome ». *Circulation Research* 115 (1): 115-30. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.301146>.
- Lang, Irene. 2015. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Distinct Disease Entity ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 24 (136): 246-52. <https://doi.org/10.1183/16000617.00001115>.
- Lang, Irene M., Peter Dorfmueller, et Anton Vonk Noordegraaf. 2016. « The Pathobiology of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *Annals of the American Thoracic Society* 13 Suppl 3 (juillet): S215-221. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-620AS>.
- Lang, Irene, Bernhard C. Meyer, Takeshi Ogo, Hiromi Matsubara, Marcin Kurzyna, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Eckhard Mayer, et Philippe Brenot. 2017. « Balloon Pulmonary Angioplasty in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 26 (143). <https://doi.org/10.1183/16000617.0119-2016>.
- Lavergne, Mélanie, Mohammed Derkaoui, Catherine Delmau, Didier Letourneur, Georges Uzan, et Catherine Le Visage. 2012. « Porous Polysaccharide-Based Scaffolds for Human Endothelial Progenitor Cells ». *Macromolecular Bioscience* 12 (7): 901-10. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100431>.
- Le Visage, Catherine, Olivier Gournay, Najah Benguirat, Sofiane Hamidi, Laetitia Chaussurier, Nathalie Mougnot, James A. Flanders, et al. 2012. « Mesenchymal Stem Cell Delivery into Rat Infarcted Myocardium Using a Porous Polysaccharide-Based Scaffold: A Quantitative Comparison with Endocardial Injection ». *Tissue Engineering. Part A* 18 (1-2): 35-44. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0053>.
- Lee, Hyeryon, Jae Chul Lee, Jung Hyun Kwon, Kwan Chang Kim, Min-Sun Cho, Yoon Sun Yang, Wonil Oh, et al. 2015. « The Effect of Umbilical Cord Blood Derived Mesenchymal Stem Cells in Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Hypertension Rats ». *Journal of Korean Medical Science* 30 (5): 576-85. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.5.576>.

- Li, Xiaocong, Chunyu Jiang, et Jungong Zhao. 2016. « Human Endothelial Progenitor Cells-Derived Exosomes Accelerate Cutaneous Wound Healing in Diabetic Rats by Promoting Endothelial Function ». *Journal of Diabetes and Its Complications* 30 (6): 986-92. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.05.009>.
- Liang, Olin D., S. Alex Mitsialis, Mun Seog Chang, Eleni Vergadi, Changjin Lee, Muhammad Aslam, Angeles Fernandez-Gonzalez, Xianlan Liu, Rajiv Baveja, et Stella Kourembanas. 2011. « Mesenchymal Stromal Cells Expressing Heme Oxygenase-1 Reverse Pulmonary Hypertension ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (1): 99-107. <https://doi.org/10.1002/stem.548>.
- Loisel, Fanny, Bastien Provost, Julien Guihaire, David Boulate, Nassim Arouche, Myriam Amsallem, Jennifer Arthur-Ataam, et al. 2018. « Autologous Endothelial Progenitor Cell Therapy Improves Right Ventricular Function in a Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.08.083>.
- Loisel, Fanny, Bastien Provost, François Haddad, Julien Guihaire, Myriam Amsallem, Bojan Vrtovec, Elie Fadel, Georges Uzan, et Olaf Mercier. 2018. « Stem Cell Therapy Targeting the Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension: Is It a Potential Avenue of Therapy? » *Pulmonary Circulation* 8 (2): 2045893218755979. <https://doi.org/10.1177/2045893218755979>.
- Luan, Yun, Xue Zhang, Feng Kong, Guang-Hui Cheng, Tong-Gang Qi, et Zhao-Hua Zhang. 2012. « Mesenchymal Stem Cell Prevention of Vascular Remodeling in High Flow-Induced Pulmonary Hypertension through a Paracrine Mechanism ». *International Immunopharmacology* 14 (4): 432-37. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.08.001>.
- Lundgrin, Erika L., Margaret M. Park, Jacqueline Sharp, W. H. Wilson Tang, James D. Thomas, Kewal Asosingh, Suzy A. Comhair, et al. 2013. « Fasting 2-Deoxy-2-[18F]Fluoro-D-Glucose Positron Emission Tomography to Detect Metabolic Changes in Pulmonary Arterial Hypertension Hearts over 1 Year ». *Annals of the American Thoracic Society* 10 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201206-029OC>.
- Luo, Li, Taijie Lin, Suli Zheng, Zhenguo Xie, Ming Chen, Guili Lian, Changsheng Xu, Huajun Wang, et Liangdi Xie. 2015. « Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Pulmonary Arterial Hypertension and Ameliorate Pulmonary Arterial Remodeling in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats ». *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 37 (3): 241-48. <https://doi.org/10.3109/10641963.2014.954710>.
- Maarman, Gerald, Sandrine Lecour, Ghazwan Butrous, Friedrich Thienemann, et Karen Sliwa. 2013. « A Comprehensive Review: The Evolution of Animal Models in Pulmonary Hypertension Research; Are We There Yet? » *Pulmonary Circulation* 3 (4): 739-56. <https://doi.org/10.1086/674770>.
- Madonna, Rosalinda, et Raffaele De Caterina. 2015. « Circulating Endothelial Progenitor Cells: Do They Live up to Their Name? » *Vascular Pharmacology* 67-69 (juin): 2-5. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.018>.
- Madonna, Rosalinda, Lyubomir Petrov, Maria Anna Teberino, Lamberto Manzoli, Jean-Pierre Karam, Francesca Vera Renna, Peter Ferdinandy, Claudia N. Montero-Menei, Seppo Ylä-Herttuala, et Raffaele De Caterina. 2015. « Transplantation of Adipose Tissue Mesenchymal Cells Conjugated with VEGF-Releasing Microcarriers Promotes Repair in Murine Myocardial Infarction ». *Cardiovascular Research* 108 (1): 39-49. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv197>.
- Mahmud, Ehtisham, Michael M. Madani, Nick H. Kim, David Poch, Lawrence Ang, Omid Behnamfar, Mitul P. Patel, et William R. Auger. 2018. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Evolving Therapeutic Approaches for Operable and Inoperable Disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 71 (21): 2468-86. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.04.009>.
- Mandai, Michiko, Yasuo Kurimoto, et Masayo Takahashi. 2017. « Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration ». *The New England Journal of Medicine* 377 (8): 792-93. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1706274>.

- Maron, Bradley A., et Jane A. Leopold. 2015. « Emerging Concepts in the Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension: Part II: Neurohormonal Signaling Contributes to the Pulmonary Vascular and Right Ventricular Pathophenotype of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 131 (23): 2079-91.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006980>.
- Mayer, Eckhard, Andrea M. D'Armini, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Ekkehard Grünig, Pavel Jansa, Nick H. Kim, Gerald Simonneau, et al. 2013. « Efficacy of Riociguat in Patients with Inoperable CTEPH vs Persistent/Recurrent PH after Pulmonary Endarterectomy (PEA): Results from the Phase III CHEST-1 Study ». *European Respiratory Journal* 42 (Suppl 57): 1781.
- McCann, Gerry P., C. T. Gan, Aernout M. Beek, Hans W. M. Niessen, Anton Vonk Noordegraaf, et Albert C. van Rossum. 2007. « Extent of MRI Delayed Enhancement of Myocardial Mass Is Related to Right Ventricular Dysfunction in Pulmonary Artery Hypertension ». *AJR. American Journal of Roentgenology* 188 (2): 349-55.
<https://doi.org/10.2214/AJR.05.1259>.
- Meddahi-Pellé, Anne, Aurélie Legrand, Alba Marcellan, Liliane Louedec, Didier Letourneur, et Ludwik Leibler. 2014. « Organ Repair, Hemostasis, and in Vivo Bonding of Medical Devices by Aqueous Solutions of Nanoparticles ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 53 (25): 6369-73. <https://doi.org/10.1002/anie.201401043>.
- Medina, Reinhold J., Chad L. Barber, Florence Sabatier, Françoise Dignat-George, Juan M. Melero-Martin, Kiarash Khosrotehrani, Osamu Ohneda, et al. 2017. « Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature ». *Stem Cells Translational Medicine* 6 (5): 1316-20. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0360>.
- Melero-Martin, Juan M., Maria E. De Obaldia, Soo-Young Kang, Zia A. Khan, Lei Yuan, Peter Oettgen, et Joyce Bischoff. 2008. « Engineering Robust and Functional Vascular Networks in Vivo with Human Adult and Cord Blood-Derived Progenitor Cells ». *Circulation Research* 103 (2): 194-202.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178590>.
- Menasché, P., et V. Vanneaux. 2016. « Stem Cells for the Treatment of Heart Failure ». *Current Research in Translational Medicine* 64 (2): 97-106.
<https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.04.003>.
- Menasché, Philippe. 2016. « The Future of Stem Cells: Should We Keep the “Stem” and Skip the “Cells”? ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 152 (2): 345-49.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.02.058>.
- . 2018a. « Cell Therapy Trials for Heart Regeneration - Lessons Learned and Future Directions ». *Nature Reviews. Cardiology*, mai. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0013-0>.
- . 2018b. « Stem Cell-Derived Exosomes and the Failing Heart: Small Cause, Big Effect ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 156 (3): 1089-92.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.04.018>.
- Menasché, Philippe, Ottavio Alfieri, Stefan Janssens, William McKenna, Hermann Reichenspurner, Ludovic Trinquart, Jean-Thomas Vilquin, et al. 2008. « The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial: First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation ». *Circulation* 117 (9): 1189-1200. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734103>.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Isabelle Cacciapuoti, Alexandre Parouchev, et al. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors for Severe Heart Failure Treatment: First Clinical Case Report ». *European Heart Journal* 36 (30): 2011-17.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv189>.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Alexandre Parouchev, Isabelle Cacciapuoti, et al. 2018. « Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction ». *Journal of the American College of Cardiology* 71 (4): 429-38. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.047>.

- Mercier, Olaf, et Elie Fadel. 2013. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Animal Models ». *The European Respiratory Journal* 41 (5): 1200-1206. <https://doi.org/10.1183/09031936.00101612>.
- Mercier, Olaf, Adriano Tivane, Peter Dorfmueller, Marc de Perrot, François Raoux, Benoît Decante, Saadia Eddahibi, Philippe Dartevelle, et Elie Fadel. 2013. « Piglet Model of Chronic Pulmonary Hypertension ». *Pulmonary Circulation* 3 (4): 908-15. <https://doi.org/10.1086/674757>.
- Mirsky, Rachel, Sarah Jahn, Juha W. Koskenvuo, Richard E. Sievers, Sarah M. Yim, Carissa Ritner, Harold S. Bernstein, et al. 2011. « Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension with Circulating Angiogenic Cells ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 301 (1): L12-19. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00215.2010>.
- Naeije, Robert, et Alessandra Manes. 2014. « The Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 23 (134): 476-87. <https://doi.org/10.1183/09059180.00007414>.
- Nagendran, Jayan, Gopinath Sutendra, Ian Paterson, Hunter C. Champion, Linda Webster, Brian Chiu, Al Haromy, Ivan M. Rebeyka, David B. Ross, et Evangelos D. Michelakis. 2013. « Endothelin Axis Is Upregulated in Human and Rat Right Ventricular Hypertrophy ». *Circulation Research* 112 (2): 347-54. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300448>.
- Nishiyama, Takahiko, Seiji Takatsuki, Takashi Kawakami, Yoshinori Katsumata, Takehiro Kimura, Masaharu Kataoka, Hikaru Tsuruta, et al. 2018. « Improvement in the Electrocardiograms Associated with Right Ventricular Hypertrophy after Balloon Pulmonary Angioplasty in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *International Journal of Cardiology. Heart & Vasculature* 19 (juin): 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2018.05.003>.
- Noly, Pierre-Emmanuel, Julien Guihaire, Matthieu Coblenca, Peter Dorfmueller, Elie Fadel, et Olaf Mercier. 2015. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension and Assessment of Right Ventricular Function in the Piglet ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 105 (novembre): e53133. <https://doi.org/10.3791/53133>.
- Noly, Pierre-Emmanuel, François Haddad, Jennifer Arthur-Ataam, Nathaniel Langer, Peter Dorfmueller, Fanny Loisel, Julien Guihaire, et al. 2017. « The Importance of Capillary Density-Stroke Work Mismatch for Right Ventricular Adaptation to Chronic Pressure Overload ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 154 (6): 2070-79. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.05.102>.
- Nootens, M., E. Kaufmann, T. Rector, C. Toher, D. Judd, G. S. Francis, et S. Rich. 1995. « Neurohormonal Activation in Patients with Right Ventricular Failure from Pulmonary Hypertension: Relation to Hemodynamic Variables and Endothelin Levels ». *Journal of the American College of Cardiology* 26 (7): 1581-85. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(95\)00399-1](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00399-1).
- Nuzzolo, Eugenia R., Sara Capodimonti, Maurizio Martini, Maria G. Iachininoto, Maria Bianchi, Alessandra Cocomazzi, Gina Zini, Giuseppe Leone, Luigi M. Larocca, et Luciana Teofili. 2014. « Adult and Cord Blood Endothelial Progenitor Cells Have Different Gene Expression Profiles and Immunogenic Potential ». *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue* 12 Suppl 1 (janvier): s367-374. <https://doi.org/10.2450/2013.0042-13>.
- O'Connell, Caroline, David Montani, Laurent Savale, Olivier Sitbon, Florence Parent, Andrei Seferian, Sophie Bulifon, et al. 2015. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 44 (12 Pt 2): e409-416. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2015.10.010>.
- Oikawa, Minako, Yutaka Kagaya, Hiroki Otani, Masahito Sakuma, Jun Demachi, Jun Suzuki, Tohru Takahashi, et al. 2005. « Increased [18F]Fluorodeoxyglucose Accumulation in Right Ventricular Free Wall in Patients with Pulmonary Hypertension and the Effect of Epoprostenol ». *Journal of the American College of Cardiology* 45 (11): 1849-55. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.065>.

- Okuno, Yuji, Ayako Nakamura-Ishizu, Kazuo Kishi, Toshio Suda, et Yoshiaki Kubota. 2011. « Bone Marrow-Derived Cells Serve as Proangiogenic Macrophages but Not Endothelial Cells in Wound Healing ». *Blood* 117 (19): 5264-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330720>.
- Oommen, Saji, Satsuki Yamada, Susana Cantero Peral, Katherine A. Campbell, Elizabeth S. Bruinsma, Andre Terzic, et Timothy J. Nelson. 2015. « Human Umbilical Cord Blood-Derived Mononuclear Cells Improve Murine Ventricular Function upon Intramyocardial Delivery in Right Ventricular Chronic Pressure Overload ». *Stem Cell Research & Therapy* 6 (mars): 50. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0044-y>.
- Ormiston, Mark L., Yupu Deng, Duncan J. Stewart, et David W. Courtman. 2010. « Innate Immunity in the Therapeutic Actions of Endothelial Progenitor Cells in Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 43 (5): 546-54. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0152OC>.
- Overbeek, Maria J., Koen T. B. Mouchaers, Hans M. Niessen, Awal M. Hadi, Koba Kupreishvili, Anco Boonstra, Alexandre E. Voskuyl, et al. 2010. « Characteristics of Interstitial Fibrosis and Inflammatory Cell Infiltration in Right Ventricles of Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension ». *International Journal of Rheumatology* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/604615>.
- Pepke-Zaba, Joanna, Hossein-Ardeschir Ghofrani, et Marius M. Hoeper. 2017. « Medical Management of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 26 (143). <https://doi.org/10.1183/16000617.0107-2016>.
- Pereda, Daniel, Ana García-Alvarez, Damián Sánchez-Quintana, Mario Nuño, Leticia Fernández-Friera, Rodrigo Fernández-Jiménez, José Manuel García-Ruíz, et al. 2014. « Swine Model of Chronic Postcapillary Pulmonary Hypertension with Right Ventricular Remodeling: Long-Term Characterization by Cardiac Catheterization, Magnetic Resonance, and Pathology ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 7 (5): 494-506. <https://doi.org/10.1007/s12265-014-9564-6>.
- Perrot, Marc de, John Thenganatt, Karen McRae, Jakov Moric, Olaf Mercier, Andrew Pierre, Susanna Mak, et John Granton. 2015. « Pulmonary Endarterectomy in Severe Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 34 (3): 369-75. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.09.008>.
- Peters, Erica B., Betty Liu, Nicolas Christoforou, Jennifer L. West, et George A. Truskey. 2015. « Umbilical Cord Blood-Derived Mononuclear Cells Exhibit Pericyte-Like Phenotype and Support Network Formation of Endothelial Progenitor Cells In Vitro ». *Annals of Biomedical Engineering* 43 (10): 2552-68. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1301-z>.
- Piao, Lin, Yong-Hu Fang, Virgilio J. J. Cadete, Christian Wietholt, Dalia Urboniene, Peter T. Toth, Glenn Marsboom, et al. 2010. « The Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Improves Impaired Cardiac Function and Electrical Remodeling in Two Models of Right Ventricular Hypertrophy: Resuscitating the Hibernating Right Ventricle ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 88 (1): 47-60. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0524-6>.
- Piao, Lin, Yong-Hu Fang, Kishan Parikh, John J. Ryan, Peter T. Toth, et Stephen L. Archer. 2013. « Cardiac Glutaminolysis: A Maladaptive Cancer Metabolism Pathway in the Right Ventricle in Pulmonary Hypertension ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 91 (10): 1185-97. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1064-7>.
- Piao, Lin, Yong-Hu Fang, Kishan S. Parikh, John J. Ryan, Karen M. D'Souza, Tiju Theccanat, Peter T. Toth, et al. 2012. « GRK2-Mediated Inhibition of Adrenergic and Dopaminergic Signaling in Right Ventricular Hypertrophy: Therapeutic Implications in Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 126 (24): 2859-69. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.109868>.
- Pinto, Alexander R., Alexei Ilinykh, Malina J. Ivey, Jill T. Kuwabara, Michelle L. D'Antoni, Ryan Debuque, Anjana Chandran, et al. 2016. « Revisiting Cardiac Cellular

- Composition ». *Circulation Research* 118 (3): 400-409.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307778>.
- Potus, François, Grégoire Ruffenach, Abdellaziz Dahou, Christophe Thebault, Sandra Breuils-Bonnet, Ève Tremblay, Valérie Nadeau, et al. 2015. « Downregulation of MicroRNA-126 Contributes to the Failing Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 132 (10): 932-43.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016382>.
- Rabinovitch, Marlene. 2008. « Molecular Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (7): 2372-79.
<https://doi.org/10.1172/JCI33452>.
- Rain, Silvia, Stine Andersen, Aref Najafi, Jacob Gammelgaard Schultz, Denielli da Silva Gonçalves Bós, M. Louis Handoko, Harm-Jan Bogaard, et al. 2016. « Right Ventricular Myocardial Stiffness in Experimental Pulmonary Arterial Hypertension: Relative Contribution of Fibrosis and Myofibril Stiffness ». *Circulation. Heart Failure* 9 (7). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002636>.
- Rain, Silvia, M. Louis Handoko, Pia Trip, C. Tji-Joong Gan, Nico Westerhof, Ger J. Stienen, Walter J. Paulus, et al. 2013. « Right Ventricular Diastolic Impairment in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 128 (18): 2016-25, 1-10.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001873>.
- Ranghino, A., V. Cantaluppi, C. Grange, L. Vitillo, F. Fop, L. Biancone, M. C. Deregibus, C. Tetta, G. P. Segoloni, et G. Camussi. 2012. « Endothelial Progenitor Cell-Derived Microvesicles Improve Neovascularization in a Murine Model of Hindlimb Ischemia ». *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 25 (1): 75-85.
<https://doi.org/10.1177/039463201202500110>.
- Raposo, Graça, et Willem Stoorvogel. 2013. « Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends ». *The Journal of Cell Biology* 200 (4): 373-83.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.
- Rehman, Jalees, Jingling Li, Christie M. Orschell, et Keith L. March. 2003. « Peripheral Blood “Endothelial Progenitor Cells” Are Derived from Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors ». *Circulation* 107 (8): 1164-69.
- Rehman, Jalees, Dmitry Traktuev, Jingling Li, Stephanie Merfeld-Clauss, Constance J. Temm-Grove, Jason E. Bovenkerk, Carrie L. Pell, Brian H. Johnstone, Robert V. Considine, et Keith L. March. 2004. « Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells ». *Circulation* 109 (10): 1292-98.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1>.
- Rich, Stuart, Jennifer Pogoriler, Aliya N. Husain, Peter T. Toth, Mardi Gomberg-Maitland, et Stephen L. Archer. 2010. « Long-Term Effects of Epoprostenol on the Pulmonary Vasculature in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *Chest* 138 (5): 1234-39.
<https://doi.org/10.1378/chest.09-2815>.
- Rolf, Andreas, Johannes Rixe, Won K. Kim, Johannes Börgel, Helge Möllmann, Holger M. Nef, Christoph Liebetrau, et al. 2014. « Right Ventricular Adaptation to Pulmonary Pressure Load in Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension before and after Successful Pulmonary Endarterectomy--a Cardiovascular Magnetic Resonance Study ». *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 16 (décembre): 96.
<https://doi.org/10.1186/s12968-014-0096-7>.
- Rondelet, Benoit, Céline Dewachter, François Kerbaul, Xin Kang, Pierre Fesler, Serge Brimiouille, Robert Naeije, et Laurence Dewachter. 2012. « Prolonged Overcirculation-Induced Pulmonary Arterial Hypertension as a Cause of Right Ventricular Failure ». *European Heart Journal* 33 (8): 1017-26.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr111>.
- Rothman, Abraham, Robert G. Wiencek, Stephanie Davidson, William N. Evans, Humberto Restrepo, Valeri Sarukhanov, et David Mann. 2017. « Challenges in the Development of Chronic Pulmonary Hypertension Models in Large Animals ». *Pulmonary Circulation* 7 (1): 156-66. <https://doi.org/10.1086/690099>.

- Rubin, Lewis J. 2012. « The 6-Minute Walk Test in Pulmonary Arterial Hypertension: How Far Is Enough? » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (5): 396-97. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1137ED>.
- Ruiter, G., S. Lankhorst, A. Boonstra, P. E. Postmus, S. Zweegman, N. Westerhof, W. J. van der Laarse, et A. Vonk-Noordegraaf. 2011. « Iron Deficiency Is Common in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 37 (6): 1386-91. <https://doi.org/10.1183/09031936.00100510>.
- Ruiter, Gerrina, Emmy Manders, Chris M. Happé, Ingrid Schali, Herman Groepenhoff, Luke S. Howard, Martin R. Wilkins, et al. 2015. « Intravenous Iron Therapy in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension and Iron Deficiency ». *Pulmonary Circulation* 5 (3): 466-72. <https://doi.org/10.1086/682217>.
- Ruiter, Gerrina, Yeun Ying Wong, Frances S. de Man, M. Louis Handoko, Richard T. Jaspers, Pieter E. Postmus, Nico Westerhof, Hans W. M. Niessen, Willem J. van der Laarse, et Anton Vonk-Noordegraaf. 2013. « Right Ventricular Oxygen Supply Parameters Are Decreased in Human and Experimental Pulmonary Hypertension ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 32 (2): 231-40. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2012.09.025>.
- Ryan, John J., et Stephen L. Archer. 2014. « The Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension: Disorders of Metabolism, Angiogenesis and Adrenergic Signaling in Right Ventricular Failure ». *Circulation Research* 115 (1): 176-88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301129>.
- . 2015. « Emerging Concepts in the Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension: Part I: Metabolic Plasticity and Mitochondrial Dynamics in the Pulmonary Circulation and Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 131 (19): 1691-1702. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006979>.
- Ryan, John J., Jessica Huston, Shelby Kutty, Nathan D. Hatton, Lindsay Bowman, Lian Tian, Julia E. Herr, Amer M. Johri, et Stephen L. Archer. 2015. « Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension ». *The Canadian Journal of Cardiology* 31 (4): 391-406. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.023>.
- Ryan, John J., et Ryan J. Tedford. 2015. « Diagnosing and Treating the Failing Right Heart ». *Current Opinion in Cardiology* 30 (3): 292-300. <https://doi.org/10.1097/HCO.000000000000164>.
- Samson, Nolwenn, et Roxane Paulin. 2017. « Epigenetics, Inflammation and Metabolism in Right Heart Failure Associated with Pulmonary Hypertension ». *Pulmonary Circulation* 7 (3): 572-87. <https://doi.org/10.1177/2045893217714463>.
- Sandoval, J., A. Rothman, et T. Pulido. 2001. « Atrial Septostomy for Pulmonary Hypertension ». *Clinics in Chest Medicine* 22 (3): 547-60.
- Santos-Ribeiro, Diana, Pedro Mendes-Ferreira, Carolina Maia-Rocha, Rui Adão, Adelino F. Leite-Moreira, et Carmen Brás-Silva. 2016. « Pulmonary Arterial Hypertension: Basic Knowledge for Clinicians ». *Archives of Cardiovascular Diseases* 109 (10): 550-61. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.03.004>.
- Sato, Hitoshi, Candice M. Hall, Grant W. Griffith, Kent F. Johnson, John W. McGillicuddy, Robert H. Bartlett, et Keith E. Cook. 2008. « Large Animal Model of Chronic Pulmonary Hypertension ». *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)* 54 (4): 396-400. <https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e31817efa85>.
- Sawa, Yoshiki, Shigeru Miyagawa, Taichi Sakaguchi, Tomoyuki Fujita, Akifumi Matsuyama, Atsuhiko Saito, Tatsuya Shimizu, et Teruo Okano. 2012. « Tissue Engineered Myoblast Sheets Improved Cardiac Function Sufficiently to Discontinue LVAS in a Patient with DCM: Report of a Case ». *Surgery Today* 42 (2): 181-84. <https://doi.org/10.1007/s00595-011-0106-4>.
- Schächinger, Volker, Birgit Assmus, Sandra Erbs, Albrecht Elsässer, Werner Haberbosch, Rainer Hambrecht, Jiangtao Yu, et al. 2009. « Intracoronary Infusion of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Abrogates Adverse Left Ventricular Remodelling Post-

- Acute Myocardial Infarction: Insights from the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) Trial ». *European Journal of Heart Failure* 11 (10): 973-79. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfp113>.
- Seferian, Andrei, et Gérald Simonneau. 2014. « [Pulmonary hypertension: definition, diagnostic and new classification] ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 43 (9): 935-44. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.07.005>.
- Segers, Vincent F. M., et Richard T. Lee. 2008. « Stem-Cell Therapy for Cardiac Disease ». *Nature* 451 (7181): 937-42. <https://doi.org/10.1038/nature06800>.
- Shehata, Monda L., Dirk Lossnitzer, Jan Skrok, Danielle Boyce, Noah Lechtzin, Stephen C. Mathai, Reda E. Girgis, et al. 2011. « Myocardial Delayed Enhancement in Pulmonary Hypertension: Pulmonary Hemodynamics, Right Ventricular Function, and Remodeling ». *AJR. American Journal of Roentgenology* 196 (1): 87-94. https://doi.org/10.2214/ajr.196.5_supplement.0a87.
- Sherwood, Lauralee, Stéphane Molotchnikoff, et Alain Lockhart. 2006. *Physiologie humaine*. 2e édition. Bruxelles: De Boeck.
- Shi, Q., S. Rafii, M. H. Wu, E. S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, et al. 1998. « Evidence for Circulating Bone Marrow-Derived Endothelial Cells ». *Blood* 92 (2): 362-67.
- Shimizu, Tatsuya, Hidekazu Sekine, Joseph Yang, Yuki Isoi, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi, Eiji Kobayashi, et Teruo Okano. 2006. « Polysurgery of Cell Sheet Grafts Overcomes Diffusion Limits to Produce Thick, Vascularized Myocardial Tissues ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (6): 708-10. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4715fje>.
- Silva, Amanda K. A., Maya Juenet, Anne Meddahi-Pellé, et Didier Letourneur. 2015. « Polysaccharide-Based Strategies for Heart Tissue Engineering ». *Carbohydrate Polymers* 116 (février): 267-77. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.010>.
- Simonneau, Gérald, Andrea M. D'Armini, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Friedrich Grimminger, Marius M. Hoeper, Pavel Jansa, Nick H. Kim, et al. 2015. « Riociguat for the Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Long-Term Extension Study (CHEST-2) ». *The European Respiratory Journal* 45 (5): 1293-1302. <https://doi.org/10.1183/09031936.00087114>.
- Simonneau, Gerald, Michael A. Gatzoulis, Ian Adatia, David Celermajer, Chris Denton, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, et al. 2013. « Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension ». *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl): D34-41. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.029>.
- Simon-Yarza, Teresa, Isabelle Bataille, et Didier Letourneur. 2017. « Cardiovascular Bio-Engineering: Current State of the Art ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 10 (2): 180-93. <https://doi.org/10.1007/s12265-017-9740-6>.
- Skuk, Daniel, Marlyne Goulet, et Jacques P. Tremblay. 2014. « Intramuscular Transplantation of Myogenic Cells in Primates: Importance of Needle Size, Cell Number, and Injection Volume ». *Cell Transplantation* 23 (1): 13-25. <https://doi.org/10.3727/096368912X661337>.
- Smadja, D. M., L. Mauge, O. Sanchez, J.-S. Silvestre, C. Guerin, A. Godier, P. Henno, P. Gaussem, et D. Israël-Biet. 2010. « Distinct Patterns of Circulating Endothelial Cells in Pulmonary Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 36 (6): 1284-93. <https://doi.org/10.1183/09031936.00130809>.
- Smith, Angela R., et John E. Wagner. 2009. « Alternative Haematopoietic Stem Cell Sources for Transplantation: Place of Umbilical Cord Blood ». *British Journal of Haematology* 147 (2): 246-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07828.x>.
- Somanna, Naveen K., Philipp M. Wörner, Subramanyam N. Murthy, Edward A. Pankey, Deborah J. Schächtele, Rose-Claire St Hilaire, David Jansen, et al. 2014. « Intratracheal Administration of Cyclooxygenase-1-Transduced Adipose Tissue-Derived Stem Cells Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 307 (8): H1187-1195. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00589.2013>.

- Stenmark, Kurt R., et Brian B. Graham. 2018. « Urocortin 2: Will a Drug Targeting Both the Vasculature and the Right Ventricle Be the Future of Pulmonary Hypertension Therapy? » *Cardiovascular Research* 114 (8): 1057-59. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy117>.
- Stenmark, Kurt R., Barbara Meyrick, Nazzareno Galie, Wolter J. Mooi, et Ivan F. McMurtry. 2009. « Animal Models of Pulmonary Arterial Hypertension: The Hope for Etiological Discovery and Pharmacological Cure ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (6): L1013-1032. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00217.2009>.
- Sun, Cheuk-Kwan, Fan-Yen Lee, Jiunn-Jye Sheu, Chun-Man Yuen, Sarah Chua, Sheng-Ying Chung, Han-Tan Chai, et al. 2009. « Early Combined Treatment with Cilostazol and Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Markedly Attenuates Pulmonary Arterial Hypertension in Rats ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330 (3): 718-26. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.154328>.
- Sun, Kunming, Zheng Zhou, Xinxin Ju, Yang Zhou, Jiaojiao Lan, Dongdong Chen, Hongzhi Chen, Manli Liu, et Lijuan Pang. 2016. « Combined Transplantation of Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells for Tissue Engineering: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Stem Cell Research & Therapy* 7 (1): 151. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0390-4>.
- Sun, Xiao-Qing, Antonio Abbate, et Harm-Jan Bogaard. 2017. « Role of Cardiac Inflammation in Right Ventricular Failure ». *Cardiovascular Research* 113 (12): 1441-52. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx159>.
- Suncion, Viky Y., Eduard Ghersin, Joel E. Fishman, Juan Pablo Zambrano, Vasileios Karantalis, Nicole Mandel, Katarina H. Nelson, et al. 2014. « Does Transendocardial Injection of Mesenchymal Stem Cells Improve Myocardial Function Locally or Globally?: An Analysis from the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis (POSEIDON) Randomized Trial ». *Circulation Research* 114 (8): 1292-1301. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302854>.
- Suntharalingam, Jay, Carmen M. Treacy, Natalie J. Doughty, Kimberley Goldsmith, Elaine Soon, Mark R. Toshner, Karen K. Sheares, Rodney Hughes, Nicholas W. Morrell, et Joanna Pepke-Zaba. 2008. « Long-Term Use of Sildenafil in Inoperable Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension ». *Chest* 134 (2): 229-36. <https://doi.org/10.1378/chest.07-2681>.
- Sutendra, Gopinath, Peter Dromparis, Roxane Paulin, Sotirios Zervopoulos, Alois Haromy, Jayan Nagendran, et Evangelos D. Michelakis. 2013. « A Metabolic Remodeling in Right Ventricular Hypertrophy Is Associated with Decreased Angiogenesis and a Transition from a Compensated to a Decompensated State in Pulmonary Hypertension ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 91 (11): 1315-27. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1059-4>.
- Tadic, Marijana. 2015. « Multimodality Evaluation of the Right Ventricle: An Updated Review ». *Clinical Cardiology* 38 (12): 770-76. <https://doi.org/10.1002/clc.22443>.
- Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner, et T. Asahara. 1999. « Ischemia- and Cytokine-Induced Mobilization of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells for Neovascularization ». *Nature Medicine* 5 (4): 434-38. <https://doi.org/10.1038/7434>.
- Tamura, Yuichi, Mai Kimura, Makoto Takei, Tomohiko Ono, Masataka Kuwana, Toru Satoh, Keiichi Fukuda, et Marc Humbert. 2015. « Oral Vasopressin Receptor Antagonist Tolvaptan in Right Heart Failure Due to Pulmonary Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 46 (1): 283-86. <https://doi.org/10.1183/09031936.00044915>.
- Tanabe, Nobuhiro, Takashi Kawakami, Toru Satoh, Hiromi Matsubara, Norifumi Nakanishi, Hitoshi Ogino, Yuichi Tamura, et al. 2018. « Balloon Pulmonary Angioplasty for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Systematic Review ». *Respiratory Investigation* 56 (4): 332-41. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2018.03.004>.

- Thenappan, Thenappan, Mark L. Ormiston, John J. Ryan, et Stephen L. Archer. 2018. « Pulmonary Arterial Hypertension: Pathogenesis and Clinical Management ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 360: j5492.
- Tian, Shuo, Qihai Liu, Leonid Gnatovskiy, Peter X. Ma, et Zhong Wang. 2015. « Heart Regeneration with Embryonic Cardiac Progenitor Cells and Cardiac Tissue Engineering ». *Journal of Stem Cell and Transplantation Biology* 1 (1). <https://doi.org/10.19104/jstb.2015.104>.
- Tilling, Lindsey, Philip Chowienczyk, et Brian Clapp. 2009. « Progenitors in Motion: Mechanisms of Mobilization of Endothelial Progenitor Cells ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 68 (4): 484-92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03486.x>.
- Tokita, Yukichi, Xian-Liang Tang, Qianhong Li, Marcin Wysoczynski, Kyung U. Hong, Shunichi Nakamura, Wen-Jian Wu, et al. 2016. « Repeated Administrations of Cardiac Progenitor Cells Are Markedly More Effective Than a Single Administration: A New Paradigm in Cell Therapy ». *Circulation Research* 119 (5): 635-51. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308937>.
- Veerdonk, Mariëlle C. van de, J. Tim Marcus, Harm-Jan Bogaard, et Anton Vonk Noordegraaf. 2014. « State of the Art: Advanced Imaging of the Right Ventricle and Pulmonary Circulation in Humans (2013 Grover Conference Series) ». *Pulmonary Circulation* 4 (2): 158-68. <https://doi.org/10.1086/675978>.
- Verbelen, Tom, Daniel Burkhoff, Keiichiro Kasama, Marion Delcroix, Filip Rega, et Bart Meyns. 2017. « Systolic and Diastolic Unloading by Mechanical Support of the Acute vs the Chronic Pressure Overloaded Right Ventricle ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 36 (4): 457-65. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.10.003>.
- Vogel-Claussen, Jens, Jan Skrok, Monda L. Shehata, Sukhminder Singh, Christopher T. Sibley, Danielle M. Boyce, Noah Lechtzin, et al. 2011. « Right and Left Ventricular Myocardial Perfusion Reserves Correlate with Right Ventricular Function and Pulmonary Hemodynamics in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension ». *Radiology* 258 (1): 119-27. <https://doi.org/10.1148/radiol.10100725>.
- Vonk-Noordegraaf, Anton, François Haddad, Kelly M. Chin, Paul R. Forfia, Steven M. Kawut, Joost Lumens, Robert Naeije, et al. 2013. « Right Heart Adaptation to Pulmonary Arterial Hypertension: Physiology and Pathobiology ». *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl): D22-33. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.027>.
- Vrtovec, Bojan, Gregor Poglajen, Luka Lezaic, Matjaz Sever, Aljaz Socan, Dragoslav Domanovic, Peter Cernelc, Guillermo Torre-Amione, François Haddad, et Joseph C. Wu. 2013. « Comparison of Transendocardial and Intracoronary CD34+ Cell Transplantation in Patients with Nonischemic Dilated Cardiomyopathy ». *Circulation* 128 (11 Suppl 1): S42-49. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000230>.
- Wang, Jinju, Runmin Guo, Yi Yang, Bradley Jacobs, Suhong Chen, Ifeanyi Iwuchukwu, Kenneth J. Gaines, et al. 2016. « The Novel Methods for Analysis of Exosomes Released from Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells ». *Stem Cells International* 2016: 2639728. <https://doi.org/10.1155/2016/2639728>.
- Wang, Jinju, Yun Zhong, Xiaotang Ma, Xiang Xiao, Chuanfang Cheng, Yusen Chen, Ifeanyi Iwuchukwu, et al. 2016. « Analyses of Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells Released Microvesicles by Using Microbead and Q-Dot Based Nanoparticle Tracking Analysis ». *Scientific Reports* 6 (avril): 24679. <https://doi.org/10.1038/srep24679>.
- Wang, Xing-Xiang, Fu-Rong Zhang, Yun-Peng Shang, Jun-Hui Zhu, Xu-Dong Xie, Qian-Min Tao, Jian-Hua Zhu, et Jun-Zhu Chen. 2007. « 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* 49 (14): 1566-71. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.12.037>.

- Wehman, Brody, Sudhish Sharma, Nicholas Pietris, Rachana Mishra, Osama T. Siddiqui, Grace Bigham, Tieluo Li, et al. 2016. « Mesenchymal Stem Cells Preserve Neonatal Right Ventricular Function in a Porcine Model of Pressure Overload ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 310 (11): H1816-1826. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00955.2015>.
- Wehman, Brody, Osama Siddiqui, Godly Jack, Mark Vesely, Tieluo Li, Rachana Mishra, Sudhish Sharma, Bradley S. Taylor, Bartley P. Griffith, et Sunjay Kaushal. 2016. « Intracoronary Stem Cell Delivery to the Right Ventricle: A Preclinical Study ». *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 28 (4): 817-24. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2016.10.003>.
- Westerhof, Berend E., Nabil Saouti, Willem J. van der Laarse, Nico Westerhof, et Anton Vonk Noordegraaf. 2017. « Treatment Strategies for the Right Heart in Pulmonary Hypertension ». *Cardiovascular Research* 113 (12): 1465-73. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx148>.
- Witkin, Alison S., et Richard N. Channick. 2015. « Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: The End Result of Pulmonary Embolism ». *Current Cardiology Reports* 17 (8): 63. <https://doi.org/10.1007/s11886-015-0621-9>.
- Wolferen, Serge A. van, J. Tim Marcus, Nico Westerhof, Marieke D. Spreeuwenberg, Koen M. J. Marques, Jean G. F. Bronzwaer, Ivo R. Henkens, et al. 2008. « Right Coronary Artery Flow Impairment in Patients with Pulmonary Hypertension ». *European Heart Journal* 29 (1): 120-27. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm567>.
- Wu, Rongrong, Xinyang Hu, et Jian'an Wang. 2018. « Concise Review: Optimized Strategies for Stem Cell-Based Therapy in Myocardial Repair: Clinical Translatability and Potential Limitation ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 36 (4): 482-500. <https://doi.org/10.1002/stem.2778>.
- Xia, Liang, Guo-Sheng Fu, Jin-Xiu Yang, Fu-Rong Zhang, et Xing-Xiang Wang. 2009. « Endothelial Progenitor Cells May Inhibit Apoptosis of Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: New Insights into Cell Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *Cytotherapy* 11 (4): 492-502. <https://doi.org/10.1080/14653240902960460>.
- Xu, Bin, Yang Li, Bo Deng, Xiaojing Liu, Lin Wang, et Qing-Lei Zhu. 2017. « Chitosan Hydrogel Improves Mesenchymal Stem Cell Transplant Survival and Cardiac Function Following Myocardial Infarction in Rats ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 13 (2): 588-94. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4026>.
- Yamamoto, Kimiko, Tomono Takahashi, Takayuki Asahara, Norihiko Ohura, Takaaki Sokabe, Akira Kamiya, et Joji Ando. 2003. « Proliferation, Differentiation, and Tube Formation by Endothelial Progenitor Cells in Response to Shear Stress ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 95 (5): 2081-88. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00232.2003>.
- Yang, Ke, Peng Xiang, Chengxi Zhang, Liyuan Zou, Xiao Wu, Ya Gao, Zhuang Kang, Keke He, Jinlai Liu, et Chaoquan Peng. 2011. « Magnetic Resonance Evaluation of Transplanted Mesenchymal Stem Cells after Myocardial Infarction in Swine ». *The Canadian Journal of Cardiology* 27 (6): 818-25. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2011.07.633>.
- Yen, Chia-Hung, Tzu-Hsien Tsai, Steve Leu, Yung-Lung Chen, Li-Teh Chang, Han-Tan Chai, Sheng-Ying Chung, et al. 2013. « Sildenafil Improves Long-Term Effect of Endothelial Progenitor Cell-Based Treatment for Monocrotaline-Induced Rat Pulmonary Arterial Hypertension ». *Cytotherapy* 15 (2): 209-23. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.09.002>.
- Yerebakan, Can, Eugen Sandica, Stephanie Prietz, Christian Klopsch, Murat Ugurlucan, Alexander Kaminski, Sefer Abdija, et al. 2009. « Autologous Umbilical Cord Blood Mononuclear Cell Transplantation Preserves Right Ventricular Function in a Novel Model of Chronic Right Ventricular Volume Overload ». *Cell Transplantation* 18 (8): 855-68. <https://doi.org/10.3727/096368909X471170>.

- Yip, Hon-Kan, Li-Teh Chang, Cheuk-Kwan Sun, Jiunn-Jye Sheu, Chiang-Hua Chiang, Ali A. Youssef, Fan-Yen Lee, Chiung-Jen Wu, et Morgan Fu. 2008. « Autologous Transplantation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Attenuates Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats ». *Critical Care Medicine* 36 (3): 873-80. <https://doi.org/10.1097/CCM.0B013E318165B7EA>.
- Yoder, Mervin C. 2013. « Endothelial Progenitor Cell: A Blood Cell by Many Other Names May Serve Similar Functions ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 91 (3): 285-95. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1002-8>.
- Yoder, Mervin C., Laura E. Mead, Daniel Prater, Theresa R. Krier, Karim N. Mroueh, Fang Li, Rachel Krasich, Constance J. Temm, Josef T. Prchal, et David A. Ingram. 2007. « Redefining Endothelial Progenitor Cells via Clonal Analysis and Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Principals ». *Blood* 109 (5): 1801-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043471>.
- Yoon, Chang-Hwan, Jin Hur, Kyung-Woo Park, Ji-Hyun Kim, Choon-Soo Lee, Il-Young Oh, Tae-Youn Kim, et al. 2005. « Synergistic Neovascularization by Mixed Transplantation of Early Endothelial Progenitor Cells and Late Outgrowth Endothelial Cells: The Role of Angiogenic Cytokines and Matrix Metalloproteinases ». *Circulation* 112 (11): 1618-27. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503433>.
- Yuan, Ye, Weijie Du, Jiaqi Liu, Wenya Ma, Lai Zhang, Zhimin Du, et Benzhi Cai. 2018. « Stem Cell-Derived Exosome in Cardiovascular Diseases: Macro Roles of Micro Particles ». *Frontiers in Pharmacology* 9: 547. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00547>.
- Zeng, Guang-qiao, Rong Liu, Hai-xing Liao, Xin-feng Zhang, Yuan-xin Qian, Bao-hua Liu, Qing-hong Wu, Jin Zhao, Wei-wang Gu, et Hong-tao Li. 2013. « Single Intraperitoneal Injection of Monocrotaline as a Novel Large Animal Model of Chronic Pulmonary Hypertension in Tibet Minipigs ». *PloS One* 8 (11): e78965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078965>.
- Zhang, Yuelin, Songyan Liao, Mo Yang, Xiaoting Liang, Ming-Wai Poon, Chee-Yin Wong, Junwen Wang, et al. 2012. « Improved Cell Survival and Paracrine Capacity of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Therapeutic Potential for Pulmonary Arterial Hypertension ». *Cell Transplantation* 21 (10): 2225-39. <https://doi.org/10.3727/096368912X653020>.
- Zhao, Xiaohui, Nan Wu, et Lan Huang. 2010. « Endothelial Progenitor Cells and Spleen: New Insights in Regeneration Medicine ». *Cytotherapy* 12 (1): 7-16. <https://doi.org/10.3109/14653240903300674>.
- Zhao, Yidan D., David W. Courtman, Yupu Deng, Lakshmi Kugathasan, Qiuwang Zhang, et Duncan J. Stewart. 2005. « Rescue of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Using Bone Marrow-Derived Endothelial-like Progenitor Cells: Efficacy of Combined Cell and ENOS Gene Therapy in Established Disease ». *Circulation Research* 96 (4): 442-50. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000157672.70560.7b>.
- Zhou, Lei, Zhiqiang Chen, Peter Vanderslice, Shui-Ping So, Ke-He Ruan, James T. Willerson, et Richard A. F. Dixon. 2013. « Endothelial-like Progenitor Cells Engineered to Produce Prostacyclin Rescue Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension and Provide Right Ventricle Benefits ». *Circulation* 128 (9): 982-94. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003139>.
- Zhou, Pei, Yu-Zhen Tan, Hai-Jie Wang, et Guo-Dong Wang. 2017. « Hypoxic Preconditioning-Induced Autophagy Enhances Survival of Engrafted Endothelial Progenitor Cells in Ischaemic Limb ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21 (10): 2452-64. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13167>.
- Zhou, Pingzhu, et William T. Pu. 2016. « Recounting Cardiac Cellular Composition ». *Circulation Research* 118 (3): 368-70. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308139>.
- Zhu, Jun Hui, Xing Xiang Wang, Fu Rong Zhang, Yun Peng Shang, Qian Min Tao, Jian Hua Zhu, et Jun Zhu Chen. 2008. « Safety and Efficacy of Autologous Endothelial Progenitor Cells Transplantation in Children with Idiopathic Pulmonary Arterial

Hypertension: Open-Label Pilot Study ». *Pediatric Transplantation* 12 (6): 650-55.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2007.00863.x>.

Titre : Potentiel thérapeutique des progéniteurs endothéliaux dans le traitement de la défaillance ventriculaire droite secondaire à l'hypertension artérielle pulmonaire

Mots clés : Hypertension pulmonaire, dysfonction du ventricule droit, thérapie cellulaire, cellules endothéliales progénitrices

Résumé : L'hypertension pulmonaire est une pathologie rare et grave résultant d'une obstruction des artères pulmonaires et provoquant une dysfonction cardiaque droite, caractérisée par une ischémie. C'est cette dysfonction cardiaque qui conditionne la survie des patients.

L'objectif de ce travail de thèse était de mettre au point une thérapie cellulaire permettant de soutenir le ventricule droit et ainsi de prolonger la survie des patients.

Une thérapie cellulaire à base de cellules endothéliales progénitrices, capables d'induire et de participer à l'angiogénèse, a été administrée par voie intracoronaire, intracardiaque et par l'intermédiaire d'un patch chez un modèle porcin d'hypertension pulmonaire.

Nous avons mis en évidence une amélioration de la fonction cardiaque droite, une augmentation de la densité capillaire et une diminution de l'hypertrophie suite à l'administration intracoronaire. En revanche, les injections de cellules dans le ventricule droit ont révélé une augmentation de la densité capillaire de manière localisée mais n'ont pas permis d'améliorer la fonction cardiaque. Enfin, l'administration par patch n'a pas permis la migration cellulaire dans le ventricule droit. En conclusion, l'injection intracoronaire donne des résultats pré-cliniques encourageants en améliorant la fonction du ventricule droit chez un modèle animal d'hypertension pulmonaire. Ces résultats sont à confirmer sur d'autres modèles et sont à compléter par des études mécanistiques approfondies.

Title : Therapeutical potential of endothelial progenitor cells to treat right ventricular failure secondary to pulmonary arterial hypertension

Keywords : Pulmonary hypertension, right ventricular failure, cell therapy, endothelial progenitor cells

Summary: Pulmonary hypertension is a rare and serious condition resulting from the obstruction of the pulmonary arteries and causing right ventricular dysfunction, characterized by ischemia. This cardiac dysfunction conditions the survival of patients.

The goal of this thesis work was to develop a cell therapy to support the right ventricle and thus prolong the survival of patients.

Cell therapy with endothelial progenitor cells, capable of inducing and participating in angiogenesis, has been administered intracoronally, intracardiacally and via a patch in a porcine model of pulmonary hypertension.

We found improvement in right heart function, increased capillary density, and decreased hypertrophy following intracoronary administration. In contrast, injections of cells into the right ventricle revealed a local increase in capillary density but failed to improve cardiac function. Finally, patch administration did not allow cell migration into the right ventricle. In conclusion, intracoronary injection gives encouraging preclinical results by improving the right ventricle function in an animal model of pulmonary hypertension. These results are to be confirmed on other models and need to be completed by detailed mechanistic studies.

