



HAL
open science

Hypertension pulmonaire et remodelage cardiaque en lien avec l'hyper-débit survenant après chirurgie de résection pulmonaire : physiopathologie, mécanismes cellulaires et moléculaires, nouvelles thérapies ciblées

Pierre Sentenac

► To cite this version:

Pierre Sentenac. Hypertension pulmonaire et remodelage cardiaque en lien avec l'hyper-débit survenant après chirurgie de résection pulmonaire : physiopathologie, mécanismes cellulaires et moléculaires, nouvelles thérapies ciblées. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT034 . tel-03155290

HAL Id: tel-03155290

<https://theses.hal.science/tel-03155290v1>

Submitted on 1 Mar 2021

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.

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Sciences

École doctorale CBS2 (Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé), Université de Montpellier

Unité de recherche INSERM 1046 – Laboratoire PhyMedExp

Hypertension pulmonaire et remodelage cardiaque en lien avec l'hyper-débit survenant après chirurgie de résection pulmonaire: physiopathologie, mécanismes cellulaires et moléculaires, nouvelles thérapies ciblées.

*High-blood-flow related pulmonary hypertension and heart disease after pulmonary resection surgery:
pathophysiology, cellular and molecular mechanisms, new targeted therapies.*

Présentée par Pierre SENTENAC

Le 08/12/2020

Sous la direction de Saadia EDDAHIBI

Puis Sylvain RICHARD

Devant le jury composé de

Serge ADNOT, MD, PhD, Professeur, Université Paris-Est, INSERM U955, Hôpital Henri Mondor

Rapporteur

Fabrice ANTIGNY, PhD, HDR, Chargé de Recherche, INSERM U999, Université Paris-Sud

Rapporteur

Arnaud BOURDIN, MD, PhD, Professeur, Université de Montpellier, CHU Montpellier

Président du Jury

Pascal COLSON, MD, PhD, Professeur, Université de Montpellier, CHU Montpellier

Examineur

Frédéric PERROS, PhD, HDR, Directeur de Recherche 2, INSERM U999, Université Paris-Sud

Examineur

Sylvain RICHARD, PhD, HDR, Directeur de Recherche 1, INSERM 1046, Université de Montpellier

Co-directeur

Je dédie cette Thèse à Saadia Eddahibi,
et à sa famille, à qui je souhaite apporter tout mon soutien.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Pulmonary hypertension (PH) and heart disease contribute to the high morbidity rate observed after pulmonary resection surgeries. The pathophysiology is still poorly investigated. The objective was to investigate the consequences of right pneumonectomy (PN) on the pulmonary vascular bed in rats, and to explore *in vitro* the involved mechanisms in human cells. In patients, the objective was to determine the incidence of right ventricular (RV) dysfunction during the first three days after major pulmonary resection surgery, assessed by the RV lateral wall (RVLW) longitudinal strain, a new marker of RV function.

METHODS: Sixty *Sprague-Dawley* male rats randomly underwent either a right PN or sham surgery. Ten rats per group were sacrificed on postoperative days 3, 7 and 28 (D3, D7, D28). Cardiopulmonary alterations were investigated by echocardiographic, hemodynamic and histological analyses. A competitive antagonist of the platelet-derived growth factor (PDGF)-receptor β (named A4 inhibitor) was administered between D0 and D28 in ten rats to prevent PH development. *In vitro*, the shear stress was reproduced using a FlexCell™ Tension system. A pathological cyclic stretch (18% elongation) was applied on cultured human pulmonary endothelial cells (P-ECs) to investigate the impact on pulmonary artery smooth muscle cell (PA-SMC) growth. Growth factors were dosed in P-ECs using qRT-PCR. A prospective study was conducted in the Montpellier University Hospital (France). All patients undergoing a major pulmonary resection surgery, without pre-existing PH or RV dysfunction, were eligible. A standardized echocardiography (GE® Vivid iq™) was performed preoperatively and then on postoperative days 1, 2 and 3 by the same examiner. The endpoint was the occurrence of a RV dysfunction, defined by a RV lateral wall (RVLW) longitudinal strain greater than -15%. Data are expressed as mean \pm SD.

RESULTS: Mean pulmonary arterial pressure (mPAP) gradually increased in the PN group to reach 35 ± 7 mmHg on D28 vs 18 ± 4 in sham ($P = 0.001$), likewise the proportion of muscularized distal pulmonary arteries, $83 \pm 1\%$ vs 5 ± 1 respectively ($P < 0.001$), related to *in situ* PA-SMC proliferation. The RV end-diastolic area and RV lateral wall thickness were doubled in the PN group on D28. The left ventricle ejection fraction decreased on D7 and D28 while the RV systolic function was maintained. *In vitro*, the human PA-SMC growth was significantly greater when seeded with stretched vs non-stretched P-EC media, highlighting the role of shear stress on the P-EC paracrine function. The qRT-PCR highlighted that the PDGF was the main growth factor involved. In rats, a treatment by PDGFR- β antagonist decreased the systolic PAP after pneumonectomy, from 69 ± 10 (PN) to 46 ± 6 mmHg (PN+A4) ($P = 0.0005$), and the RV hypertrophy index from 0.52 ± 0.09 to 0.42 ± 0.06 respectively ($P = 0.004$). Between February 2017 and July 2018, 110 patients were included, 92 were analyzed, mean age 65 ± 10 years, 59% male, COPD in 41% of cases, 74 lobectomy (80%), 8 pneumonectomy (9%), 6 bilobectomy (7%). In the early postoperative period, the RVLW longitudinal strain was altered in 55% of patients (CI 0.44–0.66), and dropped from $-20 \pm 7\%$ (D0) to -16 ± 6 (D3) ($P = 0.002$). The longitudinal strain of the RVLW segments (basal, middle and apex) was homogeneously altered. An altered TAPSE (less than 17 mm) was observed in 15% of patients, preferentially after pneumonectomy or bilobectomy than after lobectomy ($P = 0.04$). The tricuspid annular S wave and RV-fractional area change did not change significantly. Pulmonary hypertension (defined by systolic PAP >35 mmHg) occurred in 11% of patients, and the systolic PAP increased from 19 ± 9 (D0) to 21 ± 11 (D3) mmHg ($P = 0.006$). The only parameter correlated with the RVLW strain was the tricuspid annular S wave. We did not highlight risk factors for the development of an altered RVLW strain. To present an altered RVLW strain was not associated with poorer prognosis.

CONCLUSIONS: In rats, right pneumonectomy led to PH related to high muscularisation of distal pulmonary arteries, and was associated with a selective RV remodeling. *In vitro*, the shear stress related to high blood flow altered the pulmonary endothelial paracrine control of SMC growth. Selective PDGFR- β inhibition could be a therapeutic target. After major pulmonary resection surgery, the RVLW longitudinal strain showed an early RV dysfunction in approximately 50% of patients.

Key words: Pneumonectomy • Pulmonary hypertension • Pulmonary heart disease • Models • Animal • Endothelial cells • Growth factors • PDGF • Speckle tracking echocardiography •

RESUME

CONTEXTE ET OBJECTIFS: L'hypertension pulmonaire (HTP) et l'insuffisance cardiaque droite contribuent au taux de morbidité élevé observé après chirurgie de résection pulmonaire. La physiopathologie est encore mal connue. L'objectif était d'étudier le remodelage vasculaire pulmonaire après pneumonectomie droite (PN) chez le rat, et d'explorer *in vitro* les mécanismes impliqués sur des cellules humaines soumises à un *shear stress*. Chez les patients, l'objectif était de déterminer l'incidence de dysfonctionnement ventriculaire droite (VD) précoce après résection pulmonaire majeure, évaluée par le strain longitudinal de la paroi latérale du VD (RVLW), un nouveau marqueur de fonction systolique VD.

METHODES: Soixante rats mâles *Sprague-Dawley* ont subi soit une PN droite ou une chirurgie sham. Dix rats par groupe ont été sacrifiés au 3^{ème}, 7^{ème} et 28^{ème} jours postopératoires (J3, J7, J28). Les altérations cardio-pulmonaires ont été étudiées par des analyses échocardiographiques, hémodynamiques et histologiques. Un antagoniste compétitif du récepteur β du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- β), appelé inhibiteur A4, a été administré entre J0 et J28 chez dix rats en prévention de l'HTP. *In vitro*, le *shear stress* a été reproduit à l'aide d'un système FlexCell™ Tension. Un étirement cyclique pathologique (allongement de 18%) a été appliqué sur des cellules endothéliales pulmonaires (P-ECs) humaines pour évaluer l'impact sur la croissance des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (PA-SMCs). Les facteurs de croissance ont été dosés dans les P-ECs par qRT-PCR. Une étude prospective a été menée au CHU de Montpellier (France). Tous les patients opérés d'une chirurgie de résection pulmonaire majeure, sans hypertension pulmonaire ni dysfonction VD préexistante, étaient éligibles. Une échocardiographie standardisée (GE® Vivid iq™) a été réalisée en préopératoire puis aux jours 1, 2 et 3 postopératoires par le même examinateur. Le critère d'évaluation était la survenue d'une dysfonction VD définie par un RVLW *longitudinal strain* supérieur à -15%. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD.

RESULTATS: La pression artérielle pulmonaire (PAP) moyenne a progressivement augmenté dans le groupe PN pour atteindre 35 \pm 7 mmHg à J28 vs 18 \pm 4 (sham) ($P=0.001$), de même que la proportion d'artères pulmonaires distales muscularisées, 83 \pm 1% vs 5 \pm 1 respectivement ($P<0.001$), liée à une prolifération *in situ* de PA-SMC. La surface télé-diastolique du VD et l'épaisseur de la paroi latérale VD étaient doublées dans le groupe PN à J28. La fraction d'éjection du ventricule gauche était diminuée à J7 et J28 tandis que la fonction systolique VD était préservée. *In vitro*, la croissance des PA-SMCs humaines était significativement plus élevée avec le milieu de culture des P-ECs « *stretchées* » vs « *non stretchées* ». Cela a permis de mettre en évidence le rôle du *shear stress* sur la fonction paracrine de la P-EC. Le PDGF était le principal facteur de croissance impliqué. Chez le rat, un traitement par antagoniste du PDGFR- β a diminué la PAP systolique après PN, de 69 \pm 10 (PN) à 46 \pm 6 mmHg (PN+A4) ($P=0.0005$), et l'indice d'hypertrophie du VD de 0.52 \pm 0.09 à 0.42 \pm 0.06 respectivement ($P=0.004$). Entre Février 2017 et Juillet 2018, 110 patients ont été inclus, 92 ont été analysés, âge moyen 65 \pm 10 ans, 59% d'hommes, BPCO dans 41% des cas, 74 lobectomie (80%), 8 pneumonectomie (9%), 6 bilobectomie (7%). Le RVLW *longitudinal strain* s'altérait dans les trois premiers jours chez 55% des patients (IC 0.44–0.66), passant de -20 \pm 7% (J0) à -16 \pm 6 (J3) ($P=0.002$). Le *strain* des segments de la RVLW (basal, moyen et apex) était altéré de manière homogène. Un TAPSE altéré a été observé chez 15% des patients, préférentiellement après pneumonectomie ou bilobectomie qu'après lobectomie ($P=0.04$). L'onde S à l'anneau tricuspide et la fraction de raccourcissement de surface (RV-FAC) n'ont pas changé de manière significative. Une HTP survenait chez 11% des patients. La PAPS augmentait de 19 \pm 9 (J0) à 21 \pm 11 (J3) mmHg ($P=0.006$). Le seul paramètre corrélé avec le RVLW *strain* était l'onde S à l'anneau tricuspide. Nous n'avons pas mis en évidence de facteurs de risque ni de complications postopératoires associées à un RVLW *strain* altéré.

CONCLUSIONS: Chez le rat, la pneumonectomie droite a conduit à une HTP liée à une forte muscularisation des artères pulmonaires distales et associait un remodelage sélectif du VD. *In vitro*, le *shear stress* a modifié le contrôle paracrine des P-ECs sur la croissance des PA-SMCs. L'inhibition sélective du PDGFR- β pourrait être une cible thérapeutique. Après chirurgie de résection pulmonaire majeure, le RVLW *strain* a montré un dysfonction précoce du VD chez environ 50% des patients.

Mots clés: Pneumonectomie • Hypertension pulmonaire • Dysfonction ventriculaire droite • Modèle animal • Cellule endothéliale pulmonaire • Facteurs de croissance • PDGF • Échocardiographie.

TABLE DES MATIERES

ABSTRACT	5
RESUME	7
TABLE DES MATIERES	9
PREFACE	17
LISTE DES PUBLICATIONS	23
I. INTRODUCTION.....	25
I.1 A PROPOS D'UN CAS CLINIQUE.....	27
I. 2. CANCER DU POUMON, CHIRURGIE DE RESECTION PULMONAIRE ET COMPLICATIONS POSTOPERATOIRES.....	29
I. 2. 1. Le cancer du poumon.....	29
I. 2. 2. Place de la chirurgie pulmonaire dans cadre du traitement curatif du cancer du poumon	29
I. 2. 3. Complications postopératoires après chirurgie de résection pulmonaire	31
I. 3. L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE	34
I. 3. 1. L'hypertension pulmonaire : définition et classification	34
I. 3. 2. Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique et mutation BMPR2	37
I. 3. 3. Hypertension pulmonaire après pneumonectomie.....	39
I. 3. 4. Physiopathologie de l'HTP post-pneumonectomie : un <i>puzzle</i> physiopathologique.....	44
I. 3. 5. Autres modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire liée à un hyperdébit.....	45
I. 4. Remodelage du ventricule droit et dysfonction cardiaque droite apres pneumonectomie	47
I. 4. 1. Les outils d'évaluation de la fonction cardiaque droite	47
I. 4. 2. Remodelage du VD et fonction cardiaque droite dans l'hypertension pulmonaire chronique	51
I. 4. 3. Remodelage du VD et fonction cardiaque droite après pneumonectomie.....	52
I. 5. PISTES THERAPEUTIQUES POUR PREVENIR L'HYPERTENSION PULMONAIRE POST-PNEUMONECTOMIE	56
I. 5. 1. Une hypothèse « exotique » : le pré-conditionnement pulmonaire	56

I. 5. 2. Une hypothèse « classique » : les traitements vasodilatateurs pulmonaires validés dans l’HTAP idiopathique pourraient prévenir l’HTP post-pneumectomie	57
I. 5. 3. Une hypothèse « ciblée » : les facteurs de croissance	59
I. 5. 4. Conclusion sur les pistes thérapeutiques médicamenteuses	62
II. OBJECTIFS	65
III. MATERIEL ET METHODES	69
III. 1. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE I DESCRIPTIVE.....	71
III. 1. 1. ETUDE E1 : Hypertension pulmonaire après pneumectomie : un modèle préclinique chez le rat, associé à un modèle de « shear stress » sur cellule endothéliale pulmonaire humaine.....	71
III. 1. 1. 1. Modèle Animal (Etude <i>in vivo</i>).....	71
III. 1. 1. 1. 1. Réglementation en expérimentation animale	71
III. 1. 1. 1. 2. Groupes étudiés	73
III. 1. 1. 1. 3. Modèle expérimental de pneumectomie droite chez le rat.....	73
III. 1. 1. 1. 4. Etude de l’hypertension pulmonaire et du remodelage vasculaire pulmonaire	76
III. 1. 1. 1. 5. Etude du remodelage cardiaque et de la fonction cardiaque.....	79
III. 1. 1. 1. 6. Evaluation de l’œdème pulmonaire après pneumectomie	82
III. 1. 1. 1. 7. Etude des mécanismes moléculaires	83
III. 1. 1. 2. Modèle cellulaire de shear stress (Etude <i>in vitro</i>).....	84
III. 1. 1. 2. 1. Isolement des cellules humaines	84
III. 1. 1. 2. 2. Mise en culture dans le système FlexCell	84
III. 1. 1. 2. 3. Protocole de RT-PCR quantitative.....	84
III. 1. 1. 3. Analyse statistique	86
III. 1. 2. ETUDE E2 : Influence de la mutation BMPR2 sur le niveau d’hypertension pulmonaire après pneumectomie droite.	87
III. 1. 2. 1. Rappel du rationnel de l’étude	87
III. 1. 2. 2. Obtention d’une souche de rats mutés BMPR2	87
III. 1. 2. 3. Hypothèse de travail.....	88
III. 1. 2. 4. Groupes étudiés et protocole expérimental	88
III. 1. 2. 5. Critère d’évaluation principal et critères secondaires	88

III. 1. 3. ETUDE E3 (projet d'étude) : Apport de nouvelles techniques dans la caractérisation du remodelage vasculaire pulmonaire et cardiaque après pneumonectomie droite chez le rat.	89
III. 1. 3. 1. Rationnel de l'étude	89
III. 1. 3. 2. Explorations complémentaires	89
III. 1. 3. 3. Statistiques et nombre de rats nécessaires.....	90
III. 2. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE II THERAPEUTIQUE	91
III. 2. 1. ETUDE T1 : Pré-conditionnement pulmonaire en prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat.....	91
III. 2. 1. 1. Hypothèse de travail.....	91
III. 2. 1. 2. Pré-conditionnement pulmonaire	91
III. 2. 1. 3. Groupes étudiés et protocole expérimental.....	92
III. 2. 1. 4. Critères d'évaluation et calcul du nombre d'animaux nécessaires	92
III. 2. 2. ETUDE T2 : Prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat par un inhibiteur sélectif du récepteur au <i>platelet-derived growth factor</i>-beta.....	93
III. 2. 2. 1. Rappel du rationnel de l'étude	93
III. 2. 2. 2. Détermination du rôle du PDGF-B sur son récepteur PDGFR-béata dans l'HTAP	95
III. 2. 2. 3. Développement d'un inhibiteur sélectif du PDGFR-Béata	95
III. 2. 2. 4. Protocole expérimental et groupes étudiés.....	97
III. 2. 2. 5. Critères d'évaluation	98
III. 2. 2. 6. Explorations complémentaires	98
III. 2. 3. ETUDE T3 : Comparaison de trois traitements vasodilatateurs pulmonaires disponibles par voie orale chez l'homme, en prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat : Sildénafil, Macitentan, Selexipag.....	99
III. 2. 3. 1. Rappel du rationnel de l'étude	99
III. 2. 3. 2. Critères d'évaluation	99
III. 2. 3. 3. Plan expérimental.....	100
III. 3. RECHERCHE CLINIQUE	103
III. 3. 1. ETUDE C1 : Modification précoce de la fonction ventriculaire droite après chirurgie de résection pulmonaire évaluée par le 2D-strain en écho-cardiographie : une cohorte prospective (RESECHO).....	103

III. 3. 1. 1. Design de l'étude.....	103
III. 3. 1. 2. Critère d'éligibilité.....	103
III. 3. 1. 3. Collection des données.....	103
III. 3. 1. 4. Protocole d'échocardiographie trans-thoracique (ETT)	104
III. 3. 1. 5. Critères de jugement	105
III. 3. 1. 6. Analyses statistiques	105
III. 3. 2. ETUDE C2 (projet d'étude) : Retentissement des résections pulmonaires majeures sur le couplage ventriculo-artériel du ventricule droit et la tolérance à l'effort à 6 mois : une étude de cohorte prospective bicentrique (ETAP study : <i>Exercise Tolerance After Pulmonary resection surgery</i>).	109
III. 3. 2. 1. Rappel du contexte et hypothèse de travail.....	109
III. 3. 2. 2. Design de l'étude.....	109
III. 3. 2. 3. Population étudiée.....	109
III. 3. 2. 4. La VO ₂ maximale comme critère de jugement principal.....	110
III. 3. 2. 5. Intervention et paramètres étudiés	111
III. 3. 2. 6. Analyse statistique	113
III. 3. 2. 7. Résultats attendus et perspectives de recherche.....	113
IV. RESULTATS	115
IV. 1. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE I DESCRIPTIVE.....	117
IV. 1. 1. ETUDE E1 : Hypertension pulmonaire après pneumonectomie : un modèle préclinique chez le rat, associé à un modèle de « shear stress » sur cellule endothéliale pulmonaire humaine.....	117
IV. 1. 1. 1. Introduction.....	117
IV. 1. 1. 2. Soumission aux revues scientifiques	117
IV. 1. 1. 3. Présentation dans des Congrès Nationaux ou Internationaux.....	118
IV. 1. 1. 4. Publication	118
IV. 1. 1. 5. « <i>Supplementary Appendix</i> » publié dans EJCTS.....	127
IV. 1. 1. 6. Résultats supplémentaires absents du « <i>Supplementary Appendix</i> ».....	134
IV. 1. 1. 7. Conclusion sur l'étude E1	138
IV. 1. 2. ETUDE E2 : Influence de la mutation BMPR2 sur L'hypertension pulmonaire après pneumonectomie.....	139
IV. 1. 2. 1. Cathétérisme pulmonaire	139
IV. 1. 2. 2. Echographie cardiaque.....	139

IV. 1. 2. 3. Conclusion pour cette étude.....	139
IV. 2. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE II THERAPEUTIQUE.....	141
IV. 2. 1. ETUDE T1 : Pré-conditionnement pulmonaire en prévention de l’hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat.....	141
IV. 2. 1. 1. Caractéristiques initiales des deux groupes	141
IV. 2. 1. 2. Résultats de survie	141
IV. 2. 1. 3. Analyses supplémentaires	142
IV. 2. 2. ETUDE T2 : Prévention de l’hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat par un inhibiteur sélectif du <i>Platelet-derived growth factor-Béta receptor</i>.	143
IV. 2. 2. 1. Introduction brève	143
IV. 2. 2. 2. Implication de la voie du PDGF-B / PDGFR-Béta dans l’HTAP	143
IV. 2. 2. 3. Développement d’un antagoniste compétitif sélectif du PDGFR-béta.....	145
IV. 2. 2. 4. Effets d’un traitement par inhibiteur A4 sur l’hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat	145
IV. 2. 2. 5. Effets d’un traitement par inhibiteur A4 en prévention de l’hypertension pulmonaire survenant après pneumonectomie chez le rat.....	146
IV. 2. 2. 6. Conclusion	147
IV. 3. RECHERCHE CLINIQUE	149
IV. 3. 1. ETUDE C1 : Modifications précoces de la fonction ventriculaire droite après chirurgie de résection pulmonaire évaluée par le 2D-strain en échocardiographie : une cohorte prospective (« RESECHO study»).....	149
IV. 3. 1. 1. Introduction.....	150
IV. 3. 1. 2. Study population	150
IV. 3. 1. 3. Postoperative alteration of the RVLW longitudinal strain	151
IV. 3. 1. 4. Incidence of RV dysfunction diagnosed by the other RV parameters.....	151
IV. 3. 1. 5. Evolution of the echocardiographic parameters over the study period.....	151
IV. 3. 1. 6. Evolution of the RV parameters in the “Altered” and “Preserved” RVLW strain groups	152
IV. 3. 1. 7. Correlation between the RVLW longitudinal strain and the other RV systolic parameters..	152
IV. 3. 1. 8. Postoperative complications	152
IV. 3. 1. 9. Preoperative risk factors for developing an “altered” RVLW strain after surgery.....	152
IV. 3. 1. 10. Conclusion	153

V. DISCUSSION	165
V. 1. PARTIE EXPERIMENTALE	167
V. 1. 1. Principaux résultats et revue de la littérature	167
V. 1. 2. Limites de l'étude animale et pistes d'amélioration.....	173
V. 2. PARTIE CLINIQUE.....	175
V. 2. 1. Rappel des principaux résultats et revue de la littérature.....	175
V. 2. 2. Conclusion et perspectives	178
VI. CONCLUSION.....	179
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	181
REFERENCES	185

PREFACE

Ces travaux de recherche sont le fruit d'une collaboration étroite et maintenant ancienne entre le Laboratoire PhyMedExp (unité INSERM 1046, Université de Montpellier) et le Département d'Anesthésie Réanimation Arnaud de Villeneuve (Centre Hospitalo-Universitaire de Montpellier). Cette préface est l'occasion pour moi de retracer la genèse de ce projet, tout en remerciant les différents intervenants qui m'ont aidé et inspiré tout au long de ce travail.

D'abord, il faut mentionner que ce travail de Thèse fait suite aux travaux du Professeur Jean-Philippe Berthet sur l'œdème pulmonaire post-pneumonectomie. Chez le cochon, ils trouvaient une hypertension pulmonaire modérée et transitoire apparaissant après pneumonectomie gauche, en lien avec un œdème pulmonaire précoce [1]. Il faut rendre hommage à Jean-Philippe pour avoir introduit cette thématique de recherche dans le laboratoire.

En 2015, le Professeur Pascal Colson, le Docteur Gianluca Samarani, et le Professeur Jean Philippe Berthet m'ont invité à monter un projet de Master sur cette thématique. L'objectif était de développer un modèle de pneumonectomie droite chez le rat, afin d'évaluer le remodelage vasculaire pulmonaire et le retentissement cardiaque, afin de tester ensuite différents traitements, dont le pré-conditionnement ischémique pulmonaire. Durant cette année de Master, j'ai bénéficié d'une bourse Année Recherche de la part de Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes (Université de Montpellier) que je remercie. J'ai suivi les cours du Master Mention « Biologie Cellulaire, physiologie et pathologie » de spécialité « *biologie, physiopathologie, pharmacologie du cœur et de la circulation* » (Biocoeur), dirigé par le Professeur Jean-Jacques Mercadier, à l'Université Paris-7. Cet enseignement était d'une richesse remarquable, je l'ai d'ailleurs recommandé à de nombreux collègues.

J'ai trouvé au Laboratoire PhyMedExp (INSERM 1046) un encadrement d'une qualité irréprochable. Saadia Eddahibi est directrice de recherche INSERM et experte française et internationale dans le domaine de l'hypertension pulmonaire. C'est elle qui m'a dirigé et soutenu tout au long de ce travail. Cette Thèse Saadia, c'est grâce à toi, c'est toi qui m'a donné l'envie et m'a offert la possibilité de poursuivre le Master par une Thèse de Science. Notre aventure commune s'est arrêtée trop tôt, malheureusement. Aussi, cette thèse est soutenue pour te rendre hommage. Je regrette que tu sois partie si tôt et garderai de toi un souvenir inébranlable. « Et Clac ... ! ».

Ce projet n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de Sylvain Richard, Directeur de Recherche et chef d'équipe INSERM, l'ingéniosité de Pierre Sicard, et la technicité de Patrice Bideaux (PhyMedExp). C'est grâce à votre soutien et celui de Saadia que j'ai persévéré dans ce projet. Johanna Arthur-Ataam et Nawel Boudraa m'ont également beaucoup aidé pour les manipulations de biologie moléculaire. Merci Sylvain d'avoir accepté de prendre la suite de la Direction de ce travail.

Notre modèle expérimental de pneumonectomie droite chez le rat fût difficile à développer. Nous nous sommes heurtés à de nombreuses contraintes techniques, avec initialement une mortalité élevée. Avec Patrice, nous n'avons cessé de modifier et d'affiner les manipulations anesthésiques et chirurgicales. Heureusement, la persévérance de l'équipe a fini par porter ses fruits, équipe qui a été aidée par l'acquisition de nouveaux matériels par le laboratoire, il faut le souligner. Dans ce modèle, nous avons mis en évidence après pneumonectomie droite un remodelage vasculaire sévère en lien avec une prolifération des cellules musculaires lisses, une hypertension pulmonaire de niveau modéré, un remodelage adapté du VD de type dilatation et hypertrophie, un œdème pulmonaire précoce et transitoire, et une inflammation péri-broncho-vasculaire. Saadia a eu l'idée brillante d'ajouter à ce modèle animal, un modèle cellulaire de *shear stress* sur cellules endothéliales pulmonaires humaines, qui a enrichi considérablement le contenu de notre publication, et nous a amenés sur la piste du PDGF (*Platelet-derived growth factor*).

Présentée au 33^{ème} congrès de l'EACTA à Manchester en 2018 (*European Association of Cardiothoracic Anesthesiology*), notre étude a obtenu le premier prix du congrès dans la catégorie *Best Oral Presentation*. Saadia et moi étions très fiers de ce résultat.

Une fois le modèle animal bien établi, différents traitements ont pu être testés dans le but de freiner le remodelage vasculaire. Le premier était le pré-conditionnement pulmonaire ischémique, qui consistait en une ischémie-reperfusion du poumon droit, avant la résection pulmonaire droite définitive. L'objectif était « d'habituer » le poumon controlatéral à recevoir la totalité du débit cardiaque. Ce traitement s'inspirait du pré-conditionnement coronarien, et s'est finalement révélé être délétère, du moins aux doses que nous avons testées.

Guidés par le modèle cellulaire de *shear stress*, dans lequel le PDGF était surexprimé dans les cellules endothéliales « *stretchées* », nous avons testé un antagoniste compétitif du PDGF-B sur le récepteur PDGFR- β , synthétisé par l'Institut des Biomolécules Max Mousseron. Initié immédiatement après pneumonectomie droite chez le rat, ce traitement diminuait l'hypertension pulmonaire mesurée un mois après l'intervention, sans bloquer complètement son développement. C'est probablement une piste thérapeutique prometteuse, à explorer dans les années futures.

Ensuite, nous voulions évaluer, dans le modèle d'HTP post-pneumonectomie, les traitements vasodilatateurs pulmonaires et antiprolifératifs déjà validés dans le traitement de l'HTAP idiopathique. Les trois traitements que nous avons prévus de tester étaient le Sildénafil (agoniste de la voie du NO, inhibiteur de la phospho-diestérase-5), le Selexipag (agoniste des récepteurs de la Prostacycline), et le Macitentan (un antagoniste du récepteur de l'Endothéline). Ce projet a été confié à Benjamin Bourdois dans le cadre d'un Master, que j'ai pu co-encadrer avec Sylvain, Pierre et Saadia. Alors que les expériences étaient en cours sur le Sildénafil, cette recherche a dû être interrompue en raison de la pandémie de COVID-19 (comme de nombreuses autres dans le laboratoire), et n'a pu être reprise par la suite.

D'autres projets étaient en cours d'élaboration. Parmi eux, il y avait un projet qui nous tenait particulièrement à cœur avec Saadia. Nous voulions étudier l'interaction des chimiothérapies anti-angiogéniques (indiquées dans certains types de cancer pulmonaire) avec l'hypertension pulmonaire se développant après pneumonectomie. En effet, notre hypothèse était qu'après pneumonectomie, se mettent en place des mécanismes de croissance pulmonaire et de néoangiogénèse, bénéfiques sur l'HTP, qui pourraient être bloqués par les anti-angiogéniques. En d'autres termes, est-ce que la thérapie ciblée anti-angiogénique n'aggrave pas l'HTP après résection pulmonaire anatomique ? Parmi les molécules anti-cancéreuses ayant des propriétés anti-angiogéniques, figure par exemple le Bevacizumab (Avastin®), un anticorps anti-VEGF-A, prescrit dans le cancer pulmonaire non à petites cellules.

Enfin, Saadia m'a confié des travaux de collaboration avec Frédéric Perros et le centre médico-chirurgical Marie-Lannelongue, experts dans l'hypertension pulmonaire (INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Université Paris-Sud - LabEx LERMIT - DHU Thorax Innovation TORINO, Le Plessis Robinson, France). Le premier travail était de tester les effets de la pneumonectomie sur des rats mutés pour le gène du BMPR2 (*bone morphogenic protein receptor type 2*), pour évaluer l'impact de la mutation sur le phénotype d'HTP post-pneumonectomie. Dans le second travail, j'ai pu apporter un peu d'aide à Saadia et Frédéric Perros pour un travail qui consistait à évaluer le phénotype « cancéreux » des cellules musculaires lisses dans l'HTAP idiopathique (*Smooth Muscle Phenotype in Idiopathic Pulmonary Hypertension: Hyper-Proliferative but not Cancerous, International Journal of Molecular Sciences, MDPI, 2019, 20*). Dans cette publication [2] nous avons montré que les cellules musculaires lisses, dans l'HTAP idiopathique, n'ont pas de phénotype cancéreux mais seulement un profil hyper-prolifératif.

Parallèlement à cette recherche expérimentale, une étude de recherche clinique prospective était menée dans le Département d'Anesthésie Réanimation Arnaud de Villeneuve (CHU Montpellier, France), intitulée « RESECHO ». Cette étude visait à déterminer l'incidence de la dysfonction ventriculaire droite précoce évaluée par le 2D-*strain* chez les patients opérés de résection pulmonaire [3]. J'ai monté ce projet en parallèle du Master, avec l'aide précieuse du Docteur Géraldine Culas. Nous nous sommes inspirés de l'étude « POP », démarrée par les Docteurs Berthet, Culas, Samarani et Gaudard en 2012, mais qui avait dû être interrompue en raison de la lourdeur technique du cathétérisme pulmonaire chez les patients opérés de chirurgie pulmonaire. En effet, les progrès de l'échographie cardiaque ont été tels au cours de la dernière décennie que l'indication de cathétérisme pulmonaire est de plus en plus restreinte. Benjamin Bourdois nous a ensuite rejoints sur ce projet pour en faire sa Thèse de Médecine. Dans notre étude, une proportion importante de patients a présenté une altération échographique du 2D-*strain* de la paroi libre du ventricule droit. Néanmoins, la signification clinique d'une altération du 2D-*strain* reste encore à déterminer. Le manuscrit est en cours de soumission. Bravo Benjamin pour ton implication et ton sérieux. Nous comptons poursuivre par une seconde étude, intitulée ETAP (*Exercise Tolerance After Pulmonary*

resection surgeries), qui visait à évaluer le retentissement des résections pulmonaires majeures sur la tolérance à l'effort et le couplage ventriculo-artériel du ventricule droit.

Pendant cette période de Thèse, et grâce au soutien de mon chef de service, le Professeur Pascal Colson, j'ai pu me rendre au *Toronto General Hospital* (Ontario, Canada) en 2017, pour effectuer un stage dans le Département d'Anesthésie Thoracique, dirigé par monsieur Peter Slinger. Le Professeur Slinger est le spécialiste mondial de l'Anesthésie Thoracique, et il est l'auteur d'importantes publications et de nombreux ouvrages sur cette thématique. J'ai appris beaucoup de choses dans ce service ; l'humilité d'abord, puis l'anglais, et surtout un autre système de pédagogie. J'espère avoir ramené en France un peu de leur sérieux, de leur professionnalisme, et quelques-unes de leurs pratiques anesthésiques.

J'ai fait de mon mieux pour avancer dans cette Thèse de Science tout en assurant mes fonctions de chef de clinique-assistant des Hôpitaux entre 2018 et 2020, dans le Département d'Anesthésie Réanimation Cardio-Thoracique Arnaud de Villeneuve. Je remercie mon chef de service et mes collègues qui m'ont permis de consacrer un peu de temps à cette Thèse malgré le sous-effectif médical dont nous avons souffert.

Durant cette période, j'ai pris beaucoup de plaisir à mener d'autres projets de Recherche Clinique en Anesthésie Thoracique, comme les projets « AIRLEAKS » et « ANESSTEVATS » qui sont terminés, ou encore les projets « I-PEEP-THO », et « URICATHOR » qui n'ont pas commencé mais pour lesquels nous avons obtenu un financement dans le cadre respectivement de l'AOI jeune chercheur 2018 et l'AOI paramédicale et Psychologue 2019 (Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation, CHU Montpellier).

Dans l'étude « AIRLEAKS » [4], avec Clément Demoly en Thèse de Médecine, Jérôme Paniego et le Docteur Laurence Solovei, nous avons cherché à corréler le débit de fuite ventilatoire, mesuré sur le ventilateur d'anesthésie en fin d'intervention après résection pulmonaire, avec la durée de bullage et de drainage postopératoire. Nous avons inclus près de 300 patients en prospectif. Les résultats de cette recherche pourraient avoir un impact majeur sur les protocoles de réhabilitation accélérée après chirurgie Thoracique.

Dans l'étude « ANESSTEVATS » [5], conduite avec Sarah Lazraq en Thèse de Médecine, et les Docteurs Marc Mourad et Hélène David, nous avons comparé deux stratégies d'analgésie pour la chirurgie de résection pulmonaire par vidéo-thoroscopie : la péridurale thoracique vs une stratégie de blocs combinés de la paroi thoracique. Dans cette étude, le « Bi-bloc » était jugé non inférieur à la péridurale en terme d'efficacité analgésique, et présentait de nets avantages en terme de réhabilitation précoce.

Tous ces projets de recherche convergent vers un objectif commun : améliorer le pronostic et le confort des patients opérés d'une chirurgie de résection pulmonaire.

Préface

A Stéphanie, amour de ma vie, et à notre Eva !

A mes parents que je ne remercierai jamais assez de m'avoir donné ce qu'ils m'ont donné,

A mes sœurs,

A ma belle famille !

LISTE DES PUBLICATIONS

En lien avec le travail de Thèse

Pierre Sentenac, Gianluca Samarani, Patrice Bideaux, Pierre Sicard, Benjamin Bourdois, Sylvain Richard, Pascal H Colson, Saadia Eddahibi, Pulmonary hypertension after pneumonectomy: a preclinical model in rats and human pulmonary endothelial cells, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Sept (2020), online first, ezaa277, <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa277>

Perros, F., Sentenac, P., Boulate, D., Manaud, G., Kotsimbos, T., Lecerf, F., Lamrani, L., Fadel, E., Mercier, O., Londono-Vallejo, A., Humbert, M., & Eddahibi, S. Smooth Muscle Phenotype in Idiopathic Pulmonary Hypertension: Hyper-Proliferative but not Cancerous. *International journal of molecular sciences*, (2019), 20(14), 3575. <https://doi.org/10.3390/ijms20143575>

Sans lien direct avec le travail de Thèse

Sentenac, P., Charbit, J., Maury, C., Bory, P., Dagod, G., Greco, F., Capdevila, X., Perrigault, P.F., The Frontal Bone Window for Transcranial Doppler Ultrasonography in Critically Ill Patients: Validation of a New Approach in the ICU. *Neurocrit Care* 33, 115–123 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12028-019-00869-3>

Mathieu Jozwiak, Matthieu Chambaz, Pierre Sentenac, Xavier Monnet, Jean-Louis Teboul. Assessment of tissue oxygenation to personalize mean arterial pressure target in patients with septic shock, *Microvascular Research*, Volume 132 (2020), 104068, ISSN 0026-2862, <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104068>

Monnet X, Cipriani F, Camous L, Sentenac P, Dres M, Krastinova E, Anguel N, Richard C, Teboul JL. The passive leg raising test to guide fluid removal in critically ill patients. *Ann Intensive Care*. (2016) Dec;6(1):46. doi: [10.1186/s13613-016-0149-1](https://doi.org/10.1186/s13613-016-0149-1)

Mourad, M., Eliet, J., Zeroual, N., Saour, M., Sentenac, P., Manna, F., Molinari, N., Gandet, T., Colson, P.H., Gaudard, P., Pulse pressure and end-tidal carbon dioxide for monitoring low native cardiac output during veno-arterial ECLS: a prospective observational study. *Crit Care* 24, 569 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03280-z>

I. INTRODUCTION

PLAN

I.1 A PROPOS D'UN CAS CLINIQUE	27
I. 2. CANCER DU POUMON, CHIRURGIE DE RESECTION PULMONAIRE ET COMPLICATIONS POSTOPERATOIRES	29
I. 2. 1. Le cancer du poumon.....	29
I. 2. 2. Place de la chirurgie pulmonaire dans cadre du traitement curatif du cancer du poumon	29
I. 2. 3. Complications postopératoires après chirurgie de résection pulmonaire	31
I. 3. L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE	34
I. 3. 1. L'hypertension pulmonaire : définition et classification	34
I. 3. 2. Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique et mutation BMPR2	37
I. 3. 3. Hypertension pulmonaire après pneumonectomie.....	39
I. 3. 4. Physiopathologie de l'HTP post-pneumonectomie : un <i>puzzle</i> physiopathologique.....	44
I. 3. 5. Autres modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire liée à un hyperdébit.....	45
I. 4. REMODELAGE DU VENTRICULE DROIT ET DYSFONCTION CARDIAQUE DROITE APRES PNEUMONECTOMIE.....	47
I. 4. 1. Les outils d'évaluation de la fonction cardiaque droite	47
I. 4. 2. Remodelage du VD et fonction cardiaque droite dans l'hypertension pulmonaire chronique.....	51
I. 4. 3. Remodelage du VD et fonction cardiaque droite après pneumonectomie.....	52
I. 5. PISTES THERAPEUTIQUES POUR PREVENIR L'HYPERTENSION PULMONAIRE POST-PNEUMONECTOMIE	56
I. 5. 1. Une hypothèse « exotique » : le pré-conditionnement pulmonaire	56
I. 5. 2. Une hypothèse « classique » : les traitements vasodilatateurs pulmonaires validés dans l'HTAP idiopathique pourraient prévenir l'HTP post-pneumonectomie	57
I. 5. 3. Une hypothèse « ciblée » : les facteurs de croissance	59
I. 5. 4. Conclusion sur les pistes thérapeutiques médicamenteuses	62

I. 1. A PROPOS D'UN CAS CLINIQUE : MONSIEUR D, 70 ANS, HYPERTENSION PULMONAIRE SEVERE ET DEFAILLANCE VENTRICULAIRE DROITE APRES PNEUMONECTOMIE GAUCHE.

Monsieur D. est un patient de 70 ans, atteint d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) post-tabagique. Il a été opéré en Mai 2019 d'une pneumonectomie gauche à l'Hôpital Arnaud de Villeneuve (CHU Montpellier, France), pour un cancer pulmonaire de type adénocarcinome envahissant la bronche souche gauche. Dans le bilan d'opérabilité, l'échographie préopératoire montre une fonction systolique du ventricule droit « limite », avec un TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*) normal à 21 mm mais une onde S (systolique) à l'anneau tricuspide en DTI (*Doppler Tissue Imaging*) diminuée, mesurée à 10 cm/s (Figure I.1). La pression artérielle pulmonaire systolique (PAPS) est légèrement au-dessus des valeurs normales, évaluée à 36 mmHg. L'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) retrouve un volume expiré maximal (VEMS) et une capacité de diffusion du CO (DLCO) supérieurs à 80% de la théorique. Aucune exploration fonctionnelle supplémentaire n'est demandée.

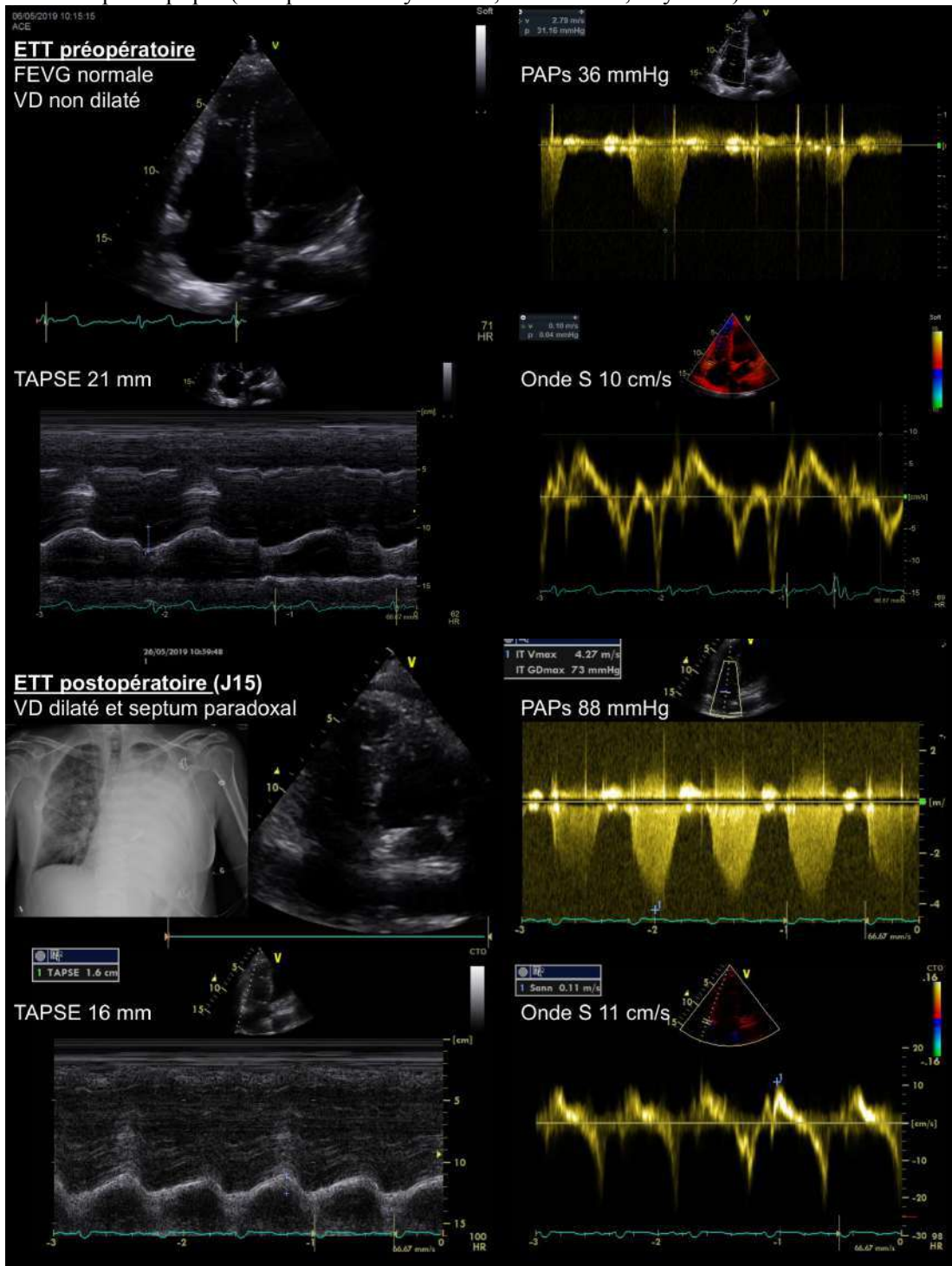
Monsieur D. est opéré en Mai 2019. Les suites opératoires sont initialement simples, autorisant son retour à domicile dans les jours qui suivent l'intervention. Deux semaines après l'opération, le patient est réadmis dans le service de Réanimation Arnaud de Villeneuve (CHU Montpellier), pour dyspnée sévère, insuffisance circulatoire avec hypotension artérielle et état de choc.

L'échographie cardiaque nous permet d'établir un diagnostic. Il a développé une hypertension pulmonaire (HTP) subaiguë et sévère, la PAP systolique est évaluée à 88 mmHg, et confirmée par le cathétérisme pulmonaire. En réponse à cette augmentation de post-charge, le ventricule droit (VD) s'est dilaté avec un VD de taille supérieure au VG (inversion du rapport VD/VG), et l'apparition d'un septum paradoxal. Le TAPSE est abaissé à 16 mm et l'onde S tricuspide en DTI inchangée, à 11 cm/s. Malgré la tachycardie, le débit cardiaque est diminué du fait d'une baisse du volume d'éjection systolique du VD, mesuré par une intégrale temps vitesse (ITV) à 14 cm. En amont, la pression de l'oreillette droite est élevée, évaluée à 15 mmHg, avec une veine cave inférieure dilatée à 21 mm et non déformable, témoignant d'une défaillance cardiaque droite.

Monsieur D. est traité par Noradrénaline et vasodilatateurs pulmonaires inhalés (monoxyde d'azote). Après trois jours sous vasopresseurs, il évolue favorablement, permettant sa sortie du service de Réanimation. A sa sortie, le patient est adressé à l'équipe de Pneumologie, pour évaluation et prise en charge de l'hypertension pulmonaire. Il présente une intolérance à l'effort sévère.

Ce cas clinique est une forme sévère d'hypertension pulmonaire et de dysfonction cardiaque droite pouvant survenir après résection pulmonaire. Il illustre bien l'importance de l'évaluation préopératoire avant résection pulmonaire majeure, notamment la fonction cardiaque droite. Il introduit les thématiques présentées dans cette Thèse.

Figure I.1. Cas clinique de monsieur D, 70 ans, atteint d'hypertension pulmonaire sévère et de défaillance ventriculaire droite après pneumonectomie gauche. Résultats de l'échographie préopératoire réalisée dans le cadre du bilan d'opérabilité (en haut). Radiographie de thorax postopératoire et résultats de l'échographie réalisée deux semaines plus tard en service de Réanimation (en bas). Images réalisées avec la machine Philips® Epiq™ (Philips Health Systems®, Amsterdam, Pays-Bas).



ETT : échographie cardiaque trans-thoracique ; VD : ventricule droit ; TAPSE : tricuspide annular plane systolic excursion ; PAPs : pression artérielle pulmonaire systolique ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche.

I. 2. CANCER DU POUMON, CHIRURGIE DE RESECTION PULMONAIRE ET COMPLICATIONS POSTOPERATOIRES

I. 2. 1. Le cancer du poumon

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, représentant un décès sur cinq par cancer [6]. En France, le cancer du poumon se situe au premier rang des décès par cancer chez l'homme et au deuxième rang chez la femme après le cancer du sein. Avec une incidence de 50 000 cas par an, il est responsable de 31 000 décès par an en France. Le facteur de risque principal du cancer broncho-pulmonaire est le tabagisme actif ou passif. D'autres facteurs environnementaux ou professionnels sont reconnus comme cancérigènes, en particulier l'amiante et les gaz d'échappement des moteurs Diesel [7].

On distingue deux grands types histologiques de cancers du poumon. Cette classification a une importance majeure car elle guide la prise en charge thérapeutique :

- Les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC) représentent près de 85 % des cancers broncho-pulmonaires. Les formes (sous-types histologiques) les plus fréquentes sont : l'adénocarcinome, le carcinome épidermoïde, le carcinome à grandes cellules. La prise en charge curative repose avant toute chose sur une exérèse chirurgicale en marges saines, éventuellement associée à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

- Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC) représentent près de 15 % des cancers broncho-pulmonaires. Pour les CBPC, la chirurgie a peu de place. Le traitement repose surtout sur la chimiothérapie, qui est associée à la radiothérapie thoracique chez les patients non métastatiques [7,8]. Du fait précisément de son fort potentiel métastatique, le CPBC représente une urgence thérapeutique.

Le pronostic du cancer du poumon reste sombre avec une survie à 5 ans de 15 % tous stades confondus. Le pronostic est corrélé à la résecabilité de la tumeur, au stade de la maladie (stade I à IV), au type histologique, à la rapidité de la prise en charge diagnostique et thérapeutique, et à l'état général du patient.

I. 2. 2. Place de la chirurgie pulmonaire dans cadre du traitement curatif du cancer du poumon

I. 2. 2. 1. La résection pulmonaire à visée carcinologique

L'indication la plus fréquente de résection pulmonaire est la chirurgie carcinologique à visée curative [8]. En ayant comme objectif de marges de résection saines (R0), l'exérèse chirurgicale est le pilier du traitement des CBNPC. Elle est recommandée dans le traitement des CBNPC de stades I, II, et comme une option thérapeutique dans le traitement des CBNPC de stade IIIA, plus rarement IIIB, lorsqu'elle fait partie d'un traitement multimodal (Figure I.2.2.1).

Figure I.2.2.1. Résumé des modalités thérapeutiques de prise en charge d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) selon son stade tumoral. D'après les recommandations de la Haute Autorité de Santé, guide affection longue durée [7].

	Stade					
	IA	IB	II	IIIA	IIIB	IV ⁽³⁾
Chirurgie	☑	☑	☑	RCP	-	-
Radiothérapie	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽²⁾	RCP	☑	-
Traitement systémique⁽⁴⁾	-	RCP	☑	☑	☑	☑

☑ Modalité thérapeutique de référence, systématique sauf si contre-indication.
RCP : Modalité en option, à discuter en réunion de concertation pluridisciplinaire selon le malade et sa maladie.

(1) La radiothérapie peut être proposée comme une alternative à la chirurgie en cas de non-opérabilité.
(2) Une irradiation peut être discutée en complément de la chirurgie et de la chimiothérapie en cas d'atteinte pariétale ou d'exérèse incomplète.
(3) Stade IV – incluant les cas avec pleurésie maligne selon la nouvelle classification TNM. Le cas particulier des tumeurs avec un nombre limité de métastases (métastase pulmonaire ou surrénalienne unique, une à trois métastases cérébrales) n'est pas inclus ici.
(4) Cytotoxiques (stades II, III et IV) ou thérapies ciblées (stade IV) (en fonction du résultat des recherches de mutations : EGFR, etc.)

1. 2. 2. 2. Les indications non carcinologiques de résection pulmonaire

Les autres indications, non carcinologiques, sont plus rares : chirurgie de réduction emphysémateuse principalement, empyème inaccessible au traitement médical, destruction pulmonaire post-traumatique, résection du poumon natif après greffe uni-pulmonaire, rares malformations congénitales.

1. 2. 2. 3. Les résections pulmonaires majeures

Parmi les différents types de résection pulmonaire, lobectomie, bi-lobectomie et pneumonectomie (PN) définissent les résections pulmonaires majeures (Figure I.2.2.3). Elles consistent en l'exérèse chirurgicale de la tumeur, de l'unité anatomique la contenant (segment, lobe ou poumon), et des aires ganglionnaires péri-bronchiques et médiastinales homolatérales. La chirurgie doit réaliser le compromis idéal entre le traitement curatif de la tumeur et le maintien de la fonction respiratoire du patient. Elle dépend du volume de la tumeur, de sa topographie, de ses extensions aux ganglions lymphatiques et aux structures de voisinage, de la réserve fonctionnelle respiratoire, de l'âge et des comorbidités du patient.

1. 2. 2. 4. Place de la pneumonectomie

La première pneumonectomie chez l'homme a été réalisée en 1933, pour un carcinome épidermoïde du lobe supérieur gauche [9]. Avec l'évolution de la médecine, des techniques d'imagerie et des techniques chirurgicales mini-invasives, les indications de résection « anatomique » comme la pneumonectomie et

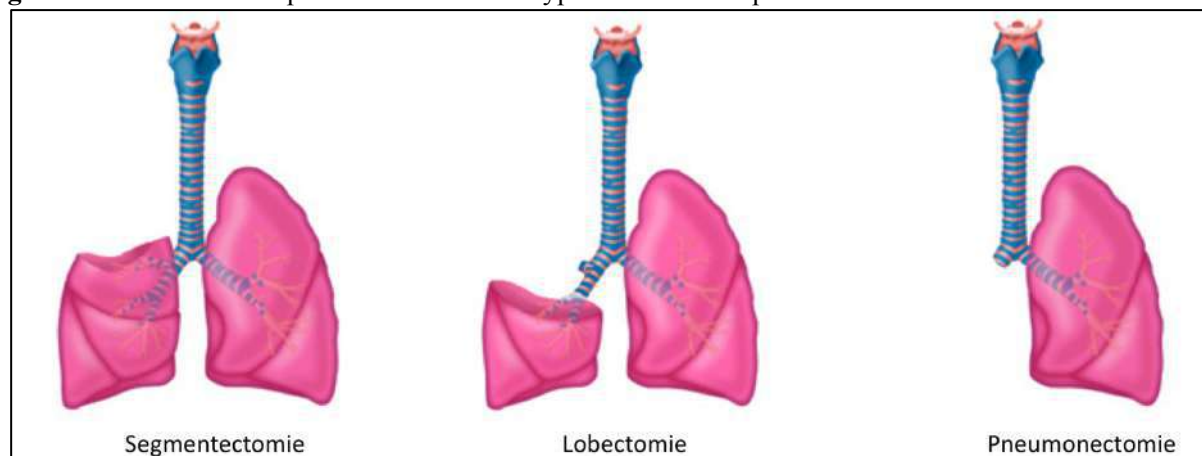
dans une moindre mesure la lobectomie, diminuent au profit des résections « épargneuses » de parenchyme (*lung-sparing surgery*), comme la segmentectomie, ou encore la résection atypique (« *wedge* » *resection*).

Malgré les progrès de la Médecine, la pneumonectomie reste la seule option curative envisageable pour des maladies de stade tumoral avancé, représentant encore 10 à 15% des résections pulmonaires réalisées en France, selon le registre français EPITHOR [10]. La pneumonectomie, est indiquée en cas de [11] :

- CBNPC de topographie centrale envahissant massivement le parenchyme pulmonaire, l'artère pulmonaire (AP) ou l'axe bronchique ;
- CBNPC de topographie périphérique mais accompagné d'un franchissement scissural massif, ou de la présence d'adénopathies scissurales et/ou hilaires métastatiques ;
- CBNPC dont l'analyse anatomopathologique révèle un envahissement néoplasique des marges de résection (artérielle, veineuse, bronchique, parenchymateuse). Dans ce cas, la pneumonectomie peut être un traitement complémentaire.

La pneumonectomie fait souvent partie d'une stratégie thérapeutique multimodale, associée avec une chimiothérapie, une thérapie ciblée, ou parfois radiothérapie adjuvante, dont la toxicité cumulée grève le pronostic postopératoire. L'intervention reste en elle-même une chirurgie à haut risque, associée à une morbi-mortalité péri-opératoire importante.

Figure I.2.2.3. Schéma représentant différents types de résection pulmonaire.



I. 2. 3. Complications postopératoires après chirurgie de résection pulmonaire

La chirurgie de résection pulmonaire est une intervention lourde grevée d'une morbidité importante à court et long terme. Le pronostic post-opératoire est lié au terrain (âge, tabagisme, comorbidités, cancer) [12], à la complexité de la chirurgie (volume de résection pulmonaire, durée de l'exclusion pulmonaire, type d'abord chirurgical par thoracoscopie ou thoracotomie), et à la capacité fonctionnelle post-opératoire prédite. La pneumonectomie est l'intervention la plus risquée, surtout du côté droit [10,12–14].

Dans une étude de cohorte portant chez 398 patients, Janet-Vendroux *et al.* décrivent une mortalité à 30 jours de 6,3% pour la PN gauche et de 12,6% pour la PN droite [12]. Dans la cohorte de 4498 patients opérés d'une pneumonectomie entre 2003 et 2013 en France (registre français EPITHOR), Thomas *et al.* confirment ce résultat, avec une mortalité globale observée de 7,8%, et un risque de décès multiplié presque par deux pour la pneumonectomie droite *vs.* gauche [10]. Les autres facteurs de risque de décès étaient un âge supérieur à 65 ans, un indice de masse corporelle faible, un score ASA (*American Society of Anesthesiologists*) supérieur ou égal à 3, ou encore une pneumonectomie « étendue » (à la paroi ou à l'arbre trachéo-bronchique).

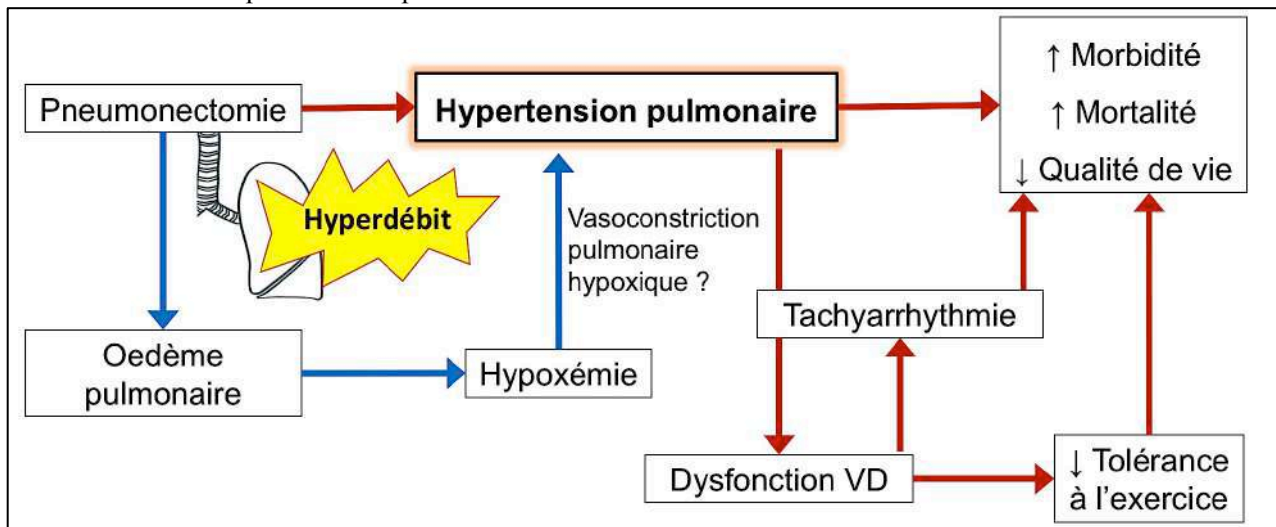
Environ un patient sur quatre présente une complication postopératoire. Les complications post-opératoires précoces sont le plus souvent d'ordre respiratoire : œdème pulmonaire, pneumonie, atélectasie, pleurésie, syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), embolie pulmonaire, paralysie diaphragmatique, drainage pleural prolongé, fistule broncho-pleurale ou broncho-œsophagienne. Ensuite, viennent les complications cardiovasculaires (infarctus du myocarde, arythmie supra-ventriculaire, hypertension pulmonaire, dysfonction ventriculaire droite, état de choc, épanchement péricardique) et hémorragiques [15–17]. Dans une série récente portant sur 153 patients opérés d'une pneumonectomie [18], l'incidence de la fibrillation atriale était de 23% et était un facteur de risque indépendant de mortalité. Ainsi, la survenue d'une complication post-opératoire a un impact majeur sur le pronostic à moyen et long terme, et sur la qualité de vie [12,18,19]. Dans leur étude de cohorte CALoR-1 portant sur 1169 patients opérés de résection pulmonaire, McCall *et al.* rapportaient un taux d'hospitalisation non programmée en réanimation de 2.6%, avec un risque de décès multiplié par 130 par rapport à ceux ne nécessitant pas la réanimation [20].

Les complications respiratoires et cardiovasculaires sont souvent intriquées et apparaissent parfois de façon concomitante. L'œdème pulmonaire post-pneumonectomie ou encore l'hypertension pulmonaire sont des exemples typiques de complications « cardio-respiratoires », dont la physiopathologie est complexe (Figure I.2.3).

L'œdème pulmonaire avait été étudié dans une précédente étude menée au Laboratoire, publiée par Berthet *et al.* en 2013 [1]. Dans ce travail de Thèse, nous avons surtout mis l'accent sur l'hypertension pulmonaire, le remodelage vasculaire pulmonaire, le remodelage cardiaque, et la dysfonction ventriculaire droite après pneumonectomie.

Il est fort probable que l'hypertension pulmonaire soit en fait bien plus fréquente que ce qui est décrit dans la littérature comme étant les complications « cliniquement décelables ». En effet, l'HTP est parfois longtemps asymptomatique, impactant dans les formes modérées la tolérance à l'exercice et la qualité de vie. Nous allons détailler cette problématique dans la prochaine section.

Figure I.2.3. Complications post-opératoires après pneumectomie : représentation schématique de l'intrication des complications respiratoires et cardiovasculaires.



VD : ventricule droit.

I. 3. L’HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE

Avant d’aborder en détail les problèmes posés par l’hypertension pulmonaire qui se développe après pneumonectomie, il est nécessaire de rappeler la définition de l’hypertension pulmonaire et sa classification.

I. 3. 1. L’hypertension pulmonaire : définition et classification

I. 3. 1. 1. Rappels hémodynamiques

La pression artérielle pulmonaire est la pression qui règne dans l’artère pulmonaire au cours du cycle cardiaque. Elle est influencée par l’éjection du ventricule droit (débit cardiaque droit, DC_{droit}), les résistances vasculaires pulmonaires (RVP ou PVR, *pulmonary vascular resistance*), et par la pression de l’oreillette gauche (POG), qui constitue la pression « de sortie » (Figure I.3.1.1). Les RVP sont situées au niveau des artères de petit calibre, artérioles, et capillaires pulmonaires. Ces paramètres sont reliés entre eux par la relation suivante :

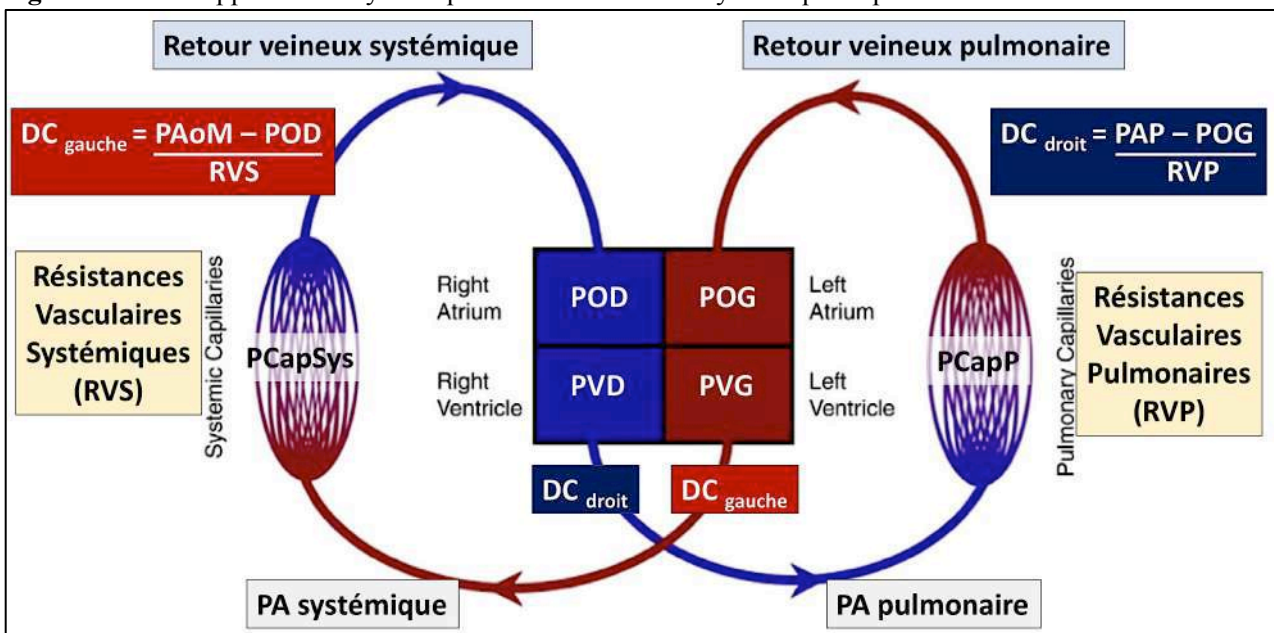
$$PAP \text{ (mmHg)} = \{DC \text{ droit (L/min)} \times RVP \text{ (unités Wood)}\} + POG \text{ (mmHg)}$$

Les valeurs normales de pression dans les cavités droites chez le sujet sain sont les suivantes (exprimées en mmHg, moyenne, {IC 95%}) :

$$POD = 3 \{1-5\} ; PAPm = 15 \{10-19\} ; PAPS = 22 \{15-30\} ; PAPd = 9 \{4-12\} ; PCapP = 8 \{4-12\} \text{ mmHg}$$

$$\text{Valeur normale de RVP} = 0,9 \{0,3 - 1,6\} \text{ WU ; Unité Wood} = \{(dyne/sec/cm^2) / 80\}$$

Figure I.3.1.1. Rappels hémodynamiques sur la circulation systémique et pulmonaire.



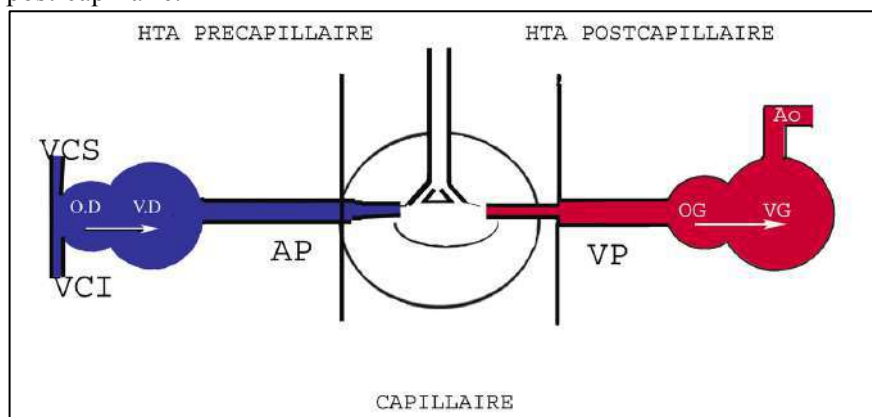
I. 3. 1. 2. Définition hémodynamique de l'hypertension pulmonaire

Dans les recommandations de 2015-2016, l'hypertension pulmonaire (HTP) est définie hémodynamiquement par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos [21].

Les experts introduisent dernièrement la notion de « groupe à risque » : les patients ayant une PAPm au repos comprise entre 20 et 25 mmHg [22].

A notre connaissance, l'HTP à l'effort n'a pas encore intégré les recommandations.

Figure I.3.1.2. Schéma simplifié représentant le niveau de l'obstruction dans l'hypertension pulmonaire pré-capillaire et post-capillaire.



I. 3. 1. 3. Classification « hémodynamique » de l'hypertension pulmonaire

Du point de vue hémodynamique, il existe trois classes d'hypertension pulmonaire selon le niveau de l'obstruction (Tableau I.3.1.3). Les trois classes sont définies en fonction du niveau de pression artérielle pulmonaire occluse (PAPO ou PCPW, *pulmonary capillary wedge pressure*) qui estime la pression capillaire pulmonaire (PCapP), et du gradient diastolique pulmonaire (DPG) qui est un bon reflet des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) :

- HTP pré-capillaire pure : PAPO < 15 mmHg : l'élévation de la PAPm est liée exclusivement à une élévation des résistances au sein de la circulation pulmonaire. La pression d'aval est normale.
- HTP post-capillaire pure (*isolated*) : PAPO > 15 mmHg et DPG < 7 mmHg et/ou RVP ≤ 3 WU : l'élévation de la PAPm est liée exclusivement à une élévation de la pression d'aval (pression veineuse pulmonaire ou pression du cœur gauche). Les RVP sont basses.
- HTP pré- et post-capillaire (*combined*) : PAPO > 15 mmHg et DPG > 7 mmHg et/ou RVP > 3 WU : il s'agit d'une forme mixte, l'élévation de la PAPm est liée à la fois à des RVP élevées et à une pression d'aval élevée.

NB : Gradient diastolique pulmonaire (DPG) = PAPd – mPCPW ; DPG ≥ 7 mmHg signe des RVP élevées.

Tableau I.3.1.3. Définition hémodynamique de l'hypertension pulmonaire, selon l'ERS/ESC guidelines [21].

Definition	Characteristics ^a	Clinical group(s) ^b
PH	PAPm \geq 25 mmHg	All
Pre-capillary PH	PAPm \geq 25 mmHg PAWP \leq 15 mmHg	1. Pulmonary arterial hypertension 3. PH due to lung diseases 4. Chronic thromboembolic PH 5. PH with unclear and/or multifactorial mechanisms
Post-capillary PH	PAPm \geq 25 mmHg PAWP $>$ 15 mmHg	2. PH due to left heart disease 5. PH with unclear and/or multifactorial mechanisms
Isolated post-capillary PH (Ipc-PH)	DPG $<$ 7 mmHg and/or PVR \leq 3 WU ^c	
Combined post-capillary and pre-capillary PH (Cpc-PH)	DPG \geq 7 mmHg and/or PVR $>$ 3 WU ^c	

CO = cardiac output; DPG = diastolic pressure gradient (diastolic PAP – mean PAWP); mPAP = mean pulmonary arterial pressure; PAWP = pulmonary arterial wedge pressure; PH = pulmonary hypertension; PVR = pulmonary vascular resistance; WU = Wood units.

I. 3. 1. 4. Symptomatologie clinique

Cliniquement, les patients sont longtemps asymptomatiques. Dans les formes évoluées, du fait d'une défaillance cardiaque droite évolutive, ils présentent d'abord des symptômes à type de dyspnée à l'effort, une fatigue, une faiblesse, des douleurs thoraciques, des lipothymies et des syncopes, contrastant toujours avec un bon état général au repos.

Les symptômes au repos signent une insuffisance cardiaque droite déjà sévère, comme une distension de la veine jugulaire, une hépatomégalie, des œdèmes des membres inférieurs et une ascite.

Les symptômes « cliniques » sont à ne pas confondre avec la classification « clinique » de l'hypertension pulmonaire, décrite ci-après.

I. 3. 1. 5. Classification « clinique »

Les maladies avec « hypertension pulmonaire » sont classées en 5 groupes « cliniques », établis en fonction des caractéristiques anatomiques, histologiques et étiologiques (Tableau I.3.1.5).

L'intérêt de cette classification « clinique » est multiple. D'abord, il y a une homologie des mécanismes physiopathologiques dans chaque groupe. Ensuite, cette classification permet d'homogénéiser les groupes pour standardiser les diagnostics, les traitements, les communications scientifiques, et pour le développement de nouveaux traitements dans les essais cliniques.

Tableau I.3.1.5. Classification clinique des maladies avec hypertension pulmonaire (d'après les recommandations ERS/ESC 2015 [21]).

1. Pulmonary arterial hypertension 1.1 Idiopathic 1.2 Heritable 1.2.1 BMPR2 mutation 1.2.2 Other mutations 1.3 Drugs and toxins induced 1.4 Associated with: 1.4.1 Connective tissue disease 1.4.2 Human immunodeficiency virus (HIV) infection 1.4.3 Portal hypertension 1.4.4 Congenital heart disease (Table 6) 1.4.5 Schistosomiasis	3. Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia 3.1 Chronic obstructive pulmonary disease 3.2 Interstitial lung disease 3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern 3.4 Sleep-disordered breathing 3.5 Alveolar hypoventilation disorders 3.6 Chronic exposure to high altitude 3.7 Developmental lung diseases (Web Table III)
1'. Pulmonary veno-occlusive disease and/or pulmonary capillary haemangiomas 1'.1 Idiopathic 1'.2 Heritable 1'.2.1 EIF2AK4 mutation 1'.2.2 Other mutations 1'.3 Drugs, toxins and radiation induced 1'.4 Associated with: 1'.4.1 Connective tissue disease 1'.4.2 HIV infection	4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension and other pulmonary artery obstructions 4.1 Chronic thromboembolic pulmonary hypertension 4.2 Other pulmonary artery obstructions 4.2.1 Angiosarcoma 4.2.2 Other intravascular tumors 4.2.3 Arteritis 4.2.4 Congenital pulmonary arteries stenoses 4.2.5 Parasites (hydatidosis)
1''. Persistent pulmonary hypertension of the newborn	5. Pulmonary hypertension with unclear and/or multifactorial mechanisms 5.1 Haematological disorders: chronic haemolytic anaemia, myeloproliferative disorders, splenectomy 5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary histiocytosis, lymphangioleiomyomatosis, neurofibromatosis 5.3 Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders 5.4 Others: pulmonary tumoral thrombotic microangiopathy, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure (with/without dialysis), segmental pulmonary hypertension
2. Pulmonary hypertension due to left heart disease 2.1 Left ventricular systolic dysfunction 2.2 Left ventricular diastolic dysfunction 2.3 Valvular disease 2.4 Congenital / acquired left heart inflow/outflow tract obstruction and congenital cardiomyopathies 2.5 Congenital /acquired pulmonary veins stenosis	

I. 3. 2. Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique et mutation BMPR2

Dans notre travail, nous avons réalisé des expériences chez des rats mutés pour le gène codant pour la protéine BMPR2. Il était important de rappeler dans cette introduction ce qu'est la mutation BMPR2 et quelle place elle occupe dans l'HTAP du groupe I.

I. 3. 2. 1. L'hypertension artérielle pulmonaire du groupe I

L'HTAP du groupe I est une maladie rare définie par l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires évoluant vers l'insuffisance cardiaque droite. La prévalence de l'HTAP est de 1 sur 67 000 en Europe. Celle-ci est probablement sous-estimée du fait de la faible spécificité des signes cliniques, dominés par la dyspnée d'effort. Cette maladie peut survenir de façon sporadique (HTAP idiopathique), dans un contexte familial (HTAP héritable), compliquer l'évolution de certaines pathologies comme les connectivites, l'infection par le VIH, l'hypertension portale, ou être secondaire à la prise d'anorexigènes.

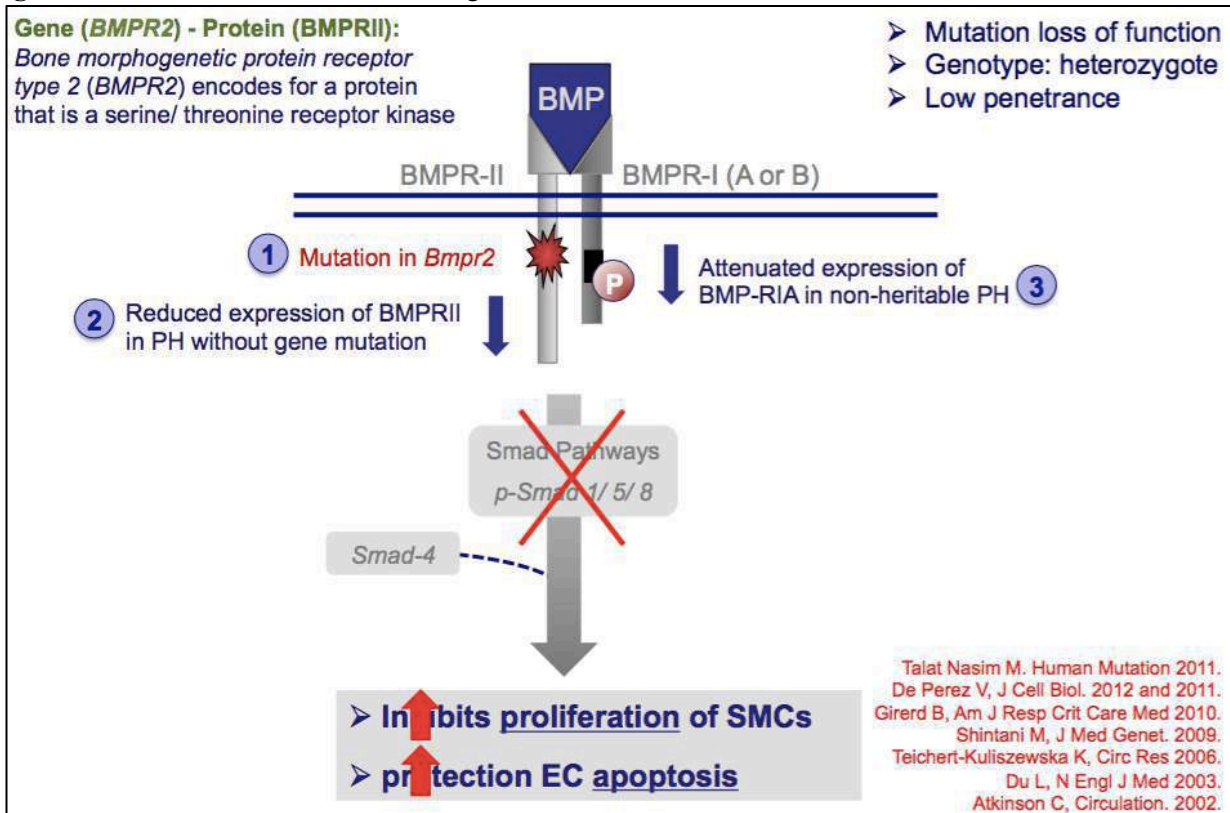
I. 3. 2. 1. Les formes « héritables » d'HTAP du groupe I et le rôle de la mutation *BMPR2*

Dans l'HTAP idiopathique, 30% des patients ont une forme héritable. Dans les formes héritables, les formes autosomiques dominantes sont les plus fréquentes. La mutation du gène codant pour la protéine *BMPR2* (*bone morphogenic protein receptor type 2*), un membre de la famille des récepteurs du TGF beta, est la principale retrouvée, représentant 83% des formes héritables. La pénétrance est variable, souvent incomplète, correspondant à différents types de mutations [23].

Les autres mutations sont plus rares, comme la mutation du gène de l'Endogline (*ALK1*) (6% des mutations), associé à la maladie de Rendu Osler, ou la mutation *KCNK3* (*Potassium two pore domain Channel subfamily K member 3*).

La mutation *BMPR2* affecte le récepteur de type 2 du TGF bêta, dimérique, dont le ligand est le BMP (Figure I.3.2.1). Le récepteur de type 1 est, lui, codé par le gène *ALK1*.

Figure I.3.2.1. Altération des voies de signalisation intracellulaire en cas de mutation *BMPR2*.



Les voies de signalisation intracellulaire sont les voies Smad 1-5 -8 et la voie de la MAP Kinase, régulant l'apoptose et la prolifération des cellules. En cas d'anomalie de signalisation BMP, impliquée dans l'apoptose, s'opère une compensation par la voie du TGF-bêta impliquée dans la prolifération, induisant en quelque sorte un déséquilibre entre les voies de l'apoptose et les voies de la prolifération.

Les patients ayant une HTAP et porteurs de la mutation BMPR2 ont une maladie de début plus précoce, et l'expression de la maladie est plus fréquente chez les femmes.

Chez l'animal, il est démontré dans plusieurs types de modèles expérimentaux, que les souris mutées pour le BMPR2 ont une HTP plus sévère que les souches « sauvages » [24]. A partir de ces constatations, notre hypothèse était qu'une mutation inactivatrice pour le BMPR2 pouvait aggraver le phénotype d'HTP après pneumonectomie.

I. 3. 3. Hypertension pulmonaire après pneumonectomie

Nous avons vu dans le [cas clinique introductif](#) et dans la [partie I.2](#) que l'hypertension pulmonaire était une complication à craindre après une chirurgie de résection pulmonaire majeure. Dans la littérature, il y a des controverses quant à l'HTP post-pneumonectomie, sa fréquence, sa sévérité, ses mécanismes, son retentissement clinique.

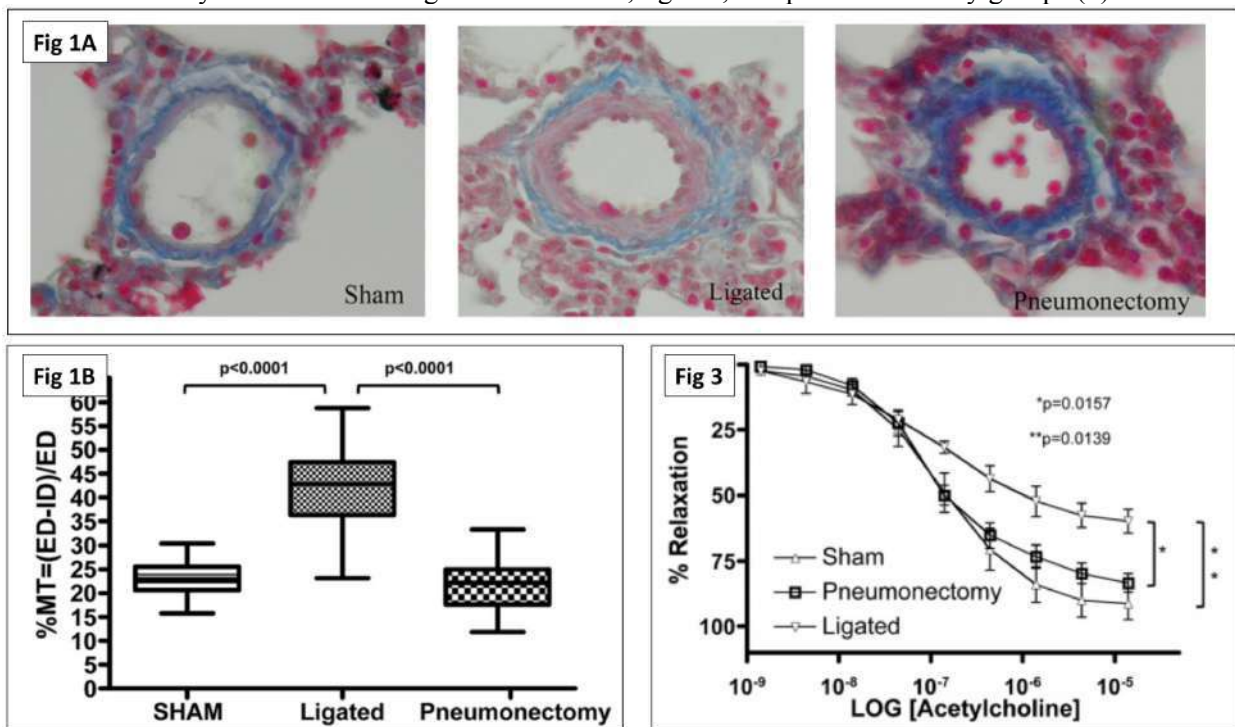
I. 3. 3. 1. Etudes animales

Malgré plusieurs études animales dans le domaine de la chirurgie de résection pulmonaire, les résultats sont discordants et présentent certaines limites. La plupart des projets étudiant la pneumonectomie seule ont été réalisés sur de petites cohortes de grands animaux [1,25,26]. Dans l'étude de Kocaturk et al. [26], la pneumonectomie était comparée à la lobectomie chez le chien. Une HTP associée à une dilatation du VD et une dysfonction diastolique VD apparaissaient dans un délai de 4 semaines après pneumonectomie. Chez le porc, Berthet *et al.* retrouvaient une élévation de la PAP dès le deuxième jour après pneumonectomie gauche, associée à une élévation des résistances vasculaires pulmonaires, et un œdème pulmonaire caractérisé par un score histologique, le « *pulmonary damage score* » [1]. Seulement, dans cette étude, les auteurs ont observé une réversibilité au moins partielle de l'HTP à 7 jours, alors que le « *pulmonary damage score* » restait élevé. Dans l'étude de Little *et al.*, les auteurs ont montré que les chiens pneumonectomisés étaient plus susceptibles de développer un œdème pulmonaire suite à un remplissage vasculaire [27], témoignant d'une altération postopératoire de la barrière alvéolo-capillaire. Mais la PAP n'était pas mesurée dans cette étude. Kuzkov *et al.* ont, eux aussi, mis le focus sur l'étude de l'œdème pulmonaire, montrant qu'une ventilation uni-pulmonaire mécanique agressive pouvait majorer l'œdème pulmonaire après pneumonectomie chez le mouton [25]. Dans cette étude, la PAP était mesurée une heure après pneumonectomie gauche, droite, ou thoracotomie, s'élevait uniquement dans le groupe PN droite, à 21 ± 3 vs 18 ± 2 mmHg dans le groupe PN gauche, et était associée à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires.

L'étude qui apporte le plus de controverses est celle publiée par Sage *et al.* en 2012 [28], raison pour laquelle nous allons en présenter les résultats en détail. Les auteurs ont comparé trois groupes de cochons,

thoracotomie droite (sham), pneumonectomie droite, et ligature de l'artère pulmonaire droite, évalués 5 semaines après la chirurgie. Dans cette étude, l'HTP et le remodelage vasculaire des artères pulmonaires distales n'était observé que dans le groupe « ligature de l'AP », alors que le phénotype des cochons pneumonectomisés était identique à celui des sham (Figure I.3.3.1.1). Cependant, les auteurs rapportent une PAPm à 16 ± 1 , 12 ± 1 et 13 ± 1 mmHg respectivement. De même, la dysfonction endothéliale ne touchait que le groupe « ligature de l'AP ». Ces résultats amènent plusieurs remarques. Premièrement, la PAP était inférieure au seuil de 25 mmHg définissant l'HTP, ce qui contraste avec le remodelage vasculaire pulmonaire sévère présenté par les auteurs. Deuxièmement, il n'y avait pas d'étude du retentissement sur le ventricule droit de cette modeste élévation de PAP, alors que l'indice d'hypertrophie du VD est un prérequis au minimum pour attester de la sévérité d'une hypertension pulmonaire. Enfin, les auteurs ont montré que l'expression des différents gènes d'intérêt dans l'HTP était dérégulée dans le poumon controlatéral, de la même manière dans le groupe « pneumonectomie » et « ligature de l'AP », avec surexpression de l'IGF (*insulin-like growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), et sous-expression des récepteurs à l'endothéline dans les deux groupes. Il est donc étonnant que cette surexpression de facteurs de croissance n'ait pas de conséquence dans le groupe pneumonectomie.

Figure I.3.3.1.1. Résultats de l'étude de Sage *et al.* (JTCVS 2012). Morphometry (x400) of PAs less than 200 μ m diameter in the sham, pneumonectomy group, and ligated groups (1A). Box plot of the percentage of media thickness of small PAs (<150 μ m) 5 weeks after procedures (1B). Vasoconstriction to ET-1 and relaxation to acetylcholine of PA rings from the sham, ligated, and pneumonectomy groups (3).



Dans les quelques études menées chez le rat, la pneumonectomie était fréquemment associée à un autre facteur pathogène (« *second hit* »), comme la monocrotaline [29–31], ou le SU5416 [32], ce qui à notre sens est moins directement pertinent pour la recherche translationnelle en chirurgie thoracique.

L'étude la plus proche de la nôtre sur le plan méthodologique est une étude chinoise publiée par Zhu *et al.* en 2012 [33]. Après pneumonectomie droite chez le rat, sans « *second hit* », la PAP doublait à 6 semaines et était associée à une muscularisation des artères pulmonaires distales et une hypertrophie du VD (Figure I.3.3.1.2). Cette étude est publiée en langue chinoise, et donc les résultats ne sont pas tous « accessibles ».

Figure I.3.3.1.2. Résultats de l'étude de Zhu *et al.* (J Cent South Univ, Med Sci, 2012, 37-10) [33].

表 1 各组大鼠 mPAP 和 RVHI 比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)			表 2 各组大鼠 (MA+PMA)%, RMT 和 RMA 比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)			
Table 1 Comparison of mPAP and RVHI in rats of each group (n=10, $\bar{x}\pm s$)			Table 2 Comparison of (MA+PMA)%, RMT and RMA in each group (n=10, $\bar{x}\pm s$)			
组别	mPAP /mmHg	RVHI	组别	(MA+PMA)%	RMT	RMA
S 组	12.24±1.42	0.20±0.02	S 组	16.98±0.53	12.49±4.51	21.76±3.53
PE1 组	18.63±1.69 ^{**}	0.24±0.01 [*]	PE1 组	17.06±0.49	11.98±3.53	21.09±2.65
PE2 组	15.92±2.72 [*]	0.27±0.03 ^{**}	PE2 组	17.45±0.51	13.08±3.24	22.98±4.13
PE4 组	19.72±1.65 ^{**}	0.28±0.02 ^{**}	PE4 组	21.43±0.29 [*]	16.73±2.45 ^{**}	27.73±4.53 [*]
PE6 组	22.32±2.13 ^{**}	0.29±0.02 ^{**}	PE6 组	27.98±0.63 ^{**}	20.12±1.78 ^{**}	29.98±4.38 [*]

与 S 组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

与 S 组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

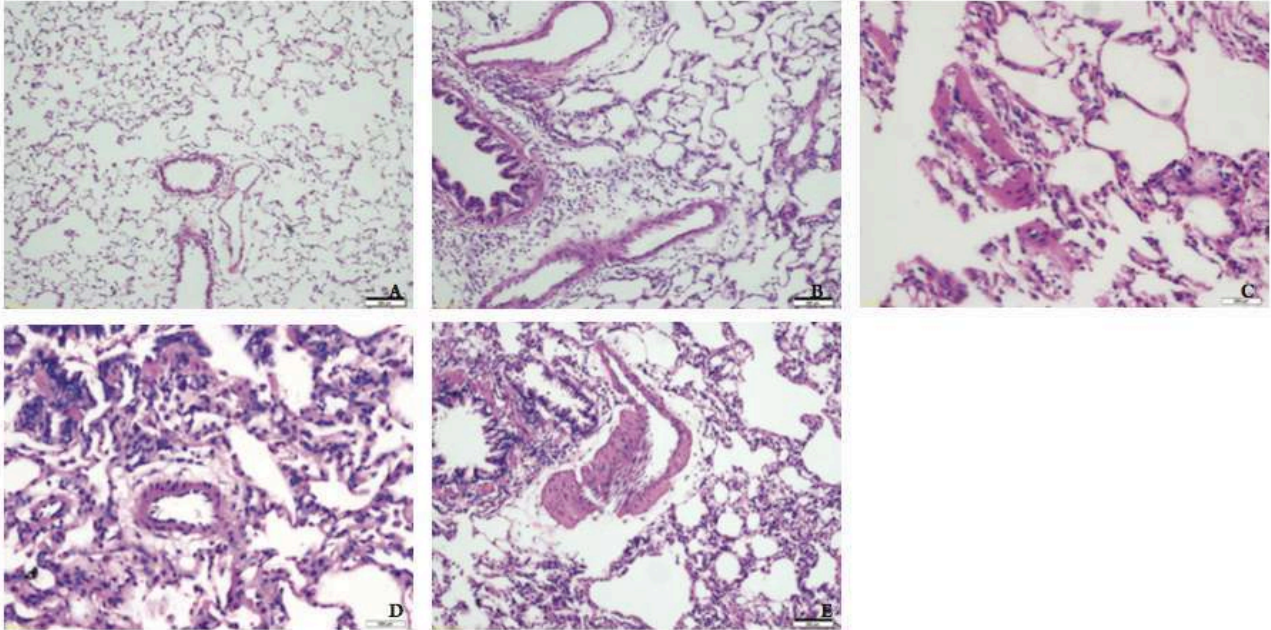


图 1 各组大鼠肺组织病理形态比较 (HE 染色, ×200)。 A: 假手术组; B: PE1 组; C: PE2 组; D: PE4 组; E: PE6 组。
Figure 1 Comparison of pathological feature of rats lung tissue in different groups (HE staining, ×200). A: Sham group; B: PE1 group; C: PE2 group; D: PE4 group; E: PE6 group.

PE1, 2, 4, 6 : postoperative week 1, 2, 4, 6 ; mPAP : mean arterial pressure ; RVHI : right ventricle hypertrophy index ; MA + PMA : muscularized arteries + partially muscularized arteries ; RMP : relative media thickness.

I. 3. 3. 2. *Etudes menées chez l'homme*

Après pneumonectomie chez l'homme, l'hypertension pulmonaire semble inconstante. Chez les patients développant cette complication, l'HTP est le plus souvent modérée, rarement sévère [34]. La sévérité de l'hypertension pulmonaire postopératoire serait fonction des comorbidités, de la fonction respiratoire sous-jacente et restante, de la fonction ventriculaire droite et de l'état des résistances vasculaires pulmonaires préopératoires [35,36].

Dans l'étude de Potaris *et al.*, l'HTP survenait chez environ 40% des patients 12 mois après pneumonectomie, modérée chez 37% et sévère chez 3% des patients [34]. Dans cette étude, les auteurs ont suivi les patients à 1, 6 et 12 mois postopératoires. La PAP systolique à 1, 6 et 12 mois était de 22 ± 7 , 27 ± 9 et 34 ± 14 mm Hg respectivement, montrant bien qu'il s'agit d'un processus progressif et non réversible *a priori*. Les auteurs ont même défini un point limite (« *cut-off* ») de PAPS à 35 mmHg, au-delà duquel la morbi-mortalité était multipliée par 18, démontrant que la survenue d'une HTP est associée à une surmortalité.

Dans l'étude de Foroulis *et al.*, les auteurs évaluaient l'HTP et la fonction VD six mois après pneumonectomie et lobectomie, chez 35 et 17 patients respectivement. La PAP systolique augmentait dans les deux groupes, 33 ± 5 mmHg après lobectomie et 41 ± 13 mmHg après pneumonectomie. Dans le sous-groupe de patients opérés d'une pneumonectomie droite, la PAP systolique atteignait 48 ± 11 mmHg [37]. Un âge avancé, une capacité vitale préopératoire réduite et une hypoxémie postopératoire étaient des facteurs prédisposants pour le développement d'une HTP postopératoire.

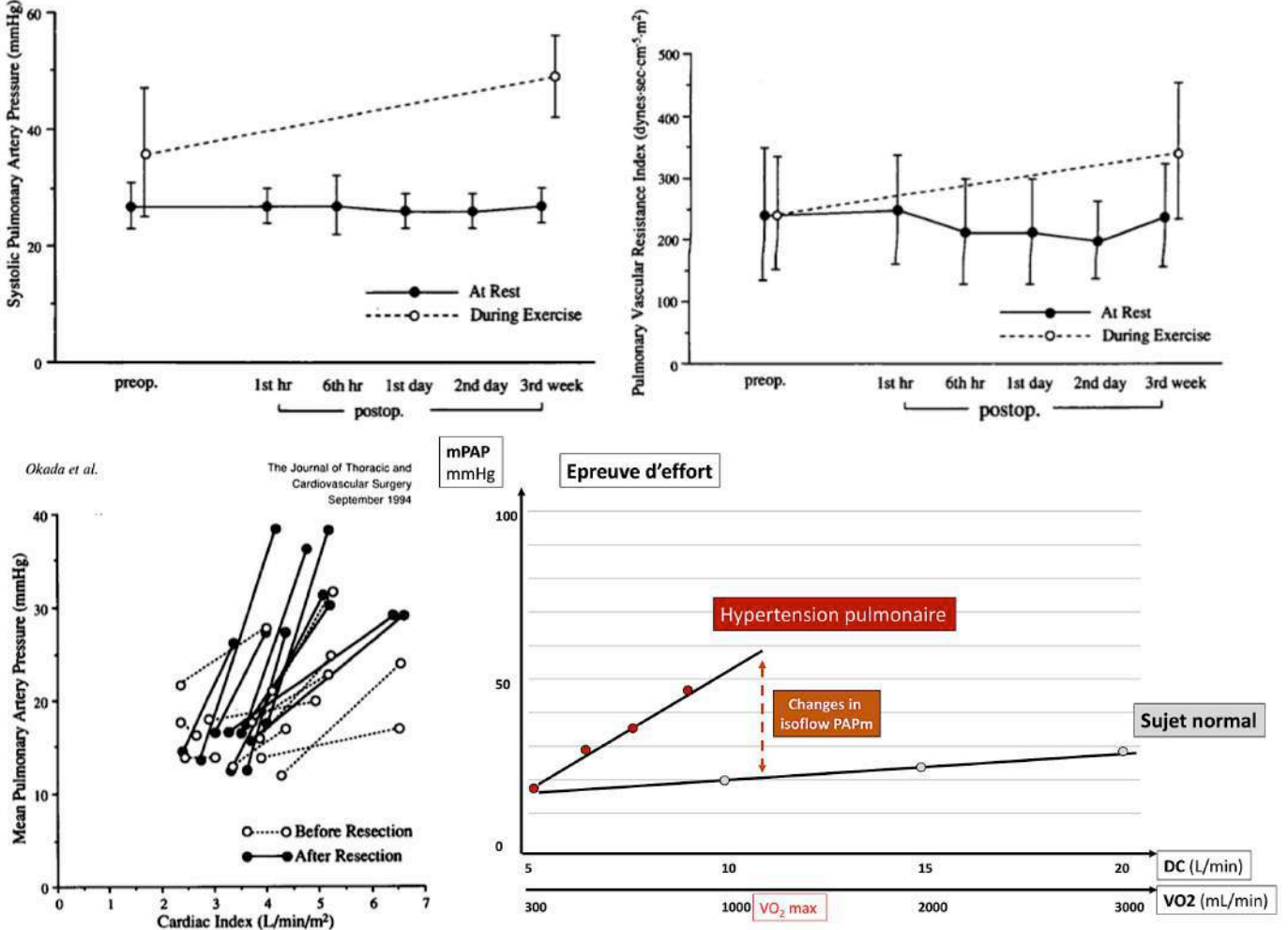
Il est probable que l'HTP post-pneumonectomie soit déclenchée ou majorée par un « *second hit* » survenant dans la période postopératoire, comme une complication pulmonaire sur le poumon restant (atélectasie, pneumopathie infectieuse, œdème pulmonaire) pourvoyeuse d'hypoxémie, ou encore par une variation importante de volémie, comme un sur-remplissage vasculaire, ou encore un choc hypovolémique ou hémorragique [38].

Cependant, si l'HTP après pneumonectomie semble inconstante chez l'homme, nous pensons que le lit vasculaire pulmonaire est pathologique dans 100% des cas, par l'altération de ses capacités de recrutement et de distension face à une augmentation de débit cardiaque à l'effort. De ce fait, la résistivité réelle du réseau vasculaire pulmonaire augmente. Donc, chez les patients opérés d'une pneumonectomie et n'ayant pas d'HTP objectivée au repos, il est probable qu'une augmentation de débit cardiaque en lien avec à l'effort démasque une HTP et une dysfonction VD « à l'effort » [39]. C'est cohérent avec notre impression clinique, par laquelle nous observons que les patients décrivent plus fréquemment une intolérance à l'effort que des symptômes au repos, altérant surtout la qualité de vie des patients.

Dans la littérature, et à notre connaissance, la seule preuve de l'HTP d'effort après pneumonectomie est apportée par l'étude d'Okada *et al.* publiée en 1994 [40]. Trois semaines après résection pulmonaire, les patients se soumettaient à une épreuve d'effort sur bicyclette ergométrique. Les auteurs ont décrit une

élévation de la PAPS à l'effort, autour de 50 mmHg, alors que la PAPS au repos était normale (Figure I.3.3.2). Bien que l'étude date de plus de 25 ans, ils ont merveilleusement bien illustré le concept de couplage ventriculo-artériel à l'effort, par la figure représentant les courbes pression-débit. Selon Okada *et al.*, les pentes des courbes pression-débit postopératoires sont plus raides que les pentes des courbes pression-débit préopératoires. Ainsi, la pente de la droite pression-débit pourrait être un bon reflet des capacités de distension et de recrutement du lit vasculaire pulmonaire restant. Nous avons illustré la notion de changement de PAPm pour un même débit (« *changes in isoflow mPAP* ») entre patient sain et patient atteint d'HTP par un schéma situé en bas à droite de la Figure I.3.3.2 ci-dessous.

Figure I.3.3.2. Evaluation de la PAP systolique (en haut à gauche) et de l'index de résistance vasculaire pulmonaire (en haut à droite), au repos et à l'effort, avant et après chirurgie de résection pulmonaire. Relation entre le débit cardiaque indexé au repos et à l'effort et les valeurs moyennes de PAP (en bas à gauche). D'après la publication d'Okada *et al.*, EJCTS 1994, Vol 108, 3 [40]. Représentation schématique du concept de changement de PAPm pour un même débit ou « *changes in isoflow mPAP* » (en bas à droite, schéma personnel).



I. 3. 4. Physiopathologie de l'HTP post-pneumonectomie : un *puzzle* physiopathologique

La physiopathologie de l'HTP dans le contexte de la pneumonectomie est unique, peu étudiée, mal connue des cliniciens, et non explicitement mentionnée dans la classification mondiale de l'hypertension pulmonaire, publiée par l'OMS et mise à jour en 2019 [22]. Les nombreux mécanismes impliqués sont complexes et conduisent à une maladie probablement multifactorielle (Figure I.3.4).

Premièrement, la ventilation uni-pulmonaire induit une hyperinflation alvéolaire, une inadéquation (*mismatch*) entre la ventilation et la perfusion et une hypoxie, qui peuvent entraîner une élévation de la pression artérielle pulmonaire par vasoconstriction hypoxique (VPH).

Deuxièmement, la réduction de moitié du lit vasculaire pulmonaire aboutit inévitablement à un hyperdébit sanguin (*overflow*) dans le poumon restant qui doit « absorber » la totalité du débit cardiaque droit. Ce principe a été démontré par l'équipe écossaise de McCall et Shelley, qui ont mesuré en IRM cardiaque les débits dans le tronc de l'artère pulmonaire et dans la branche de l'AP controlatérale à la résection [41]. Le résultat était attendu, mais encore fallait-il le prouver : le débit dans l'AP controlatérale était multiplié approximativement par un facteur deux en postopératoire.

Les contraintes pariétales (*shear stress*) exercées sur la paroi vasculaire par cet hyperdébit ont un effet direct sur la cellule endothéliale pulmonaire, régulant probablement ses fonctions de perméabilité, et sa capacité de synthèse de facteurs paracrines aussi bien vasoactifs qu'inflammatoires [42]. Ce que nous apprennent Sage *et al.* dans leur publication, c'est que l'hyperdébit n'est peut-être pas le seul facteur déclenchant (« *trigger* ») de la dysfonction endothéliale. Dans leur modèle de ligature de l'AP, ils ont montré que l'ischémie du poumon était supérieure aux seuls effets de la pneumonectomie pour provoquer une dysfonction endothéliale, mesurée dans cette étude par l'étude de la vasorelaxation à l'acétylcholine et par le dosage de eNOS (*endothelial NO synthase*) [28].

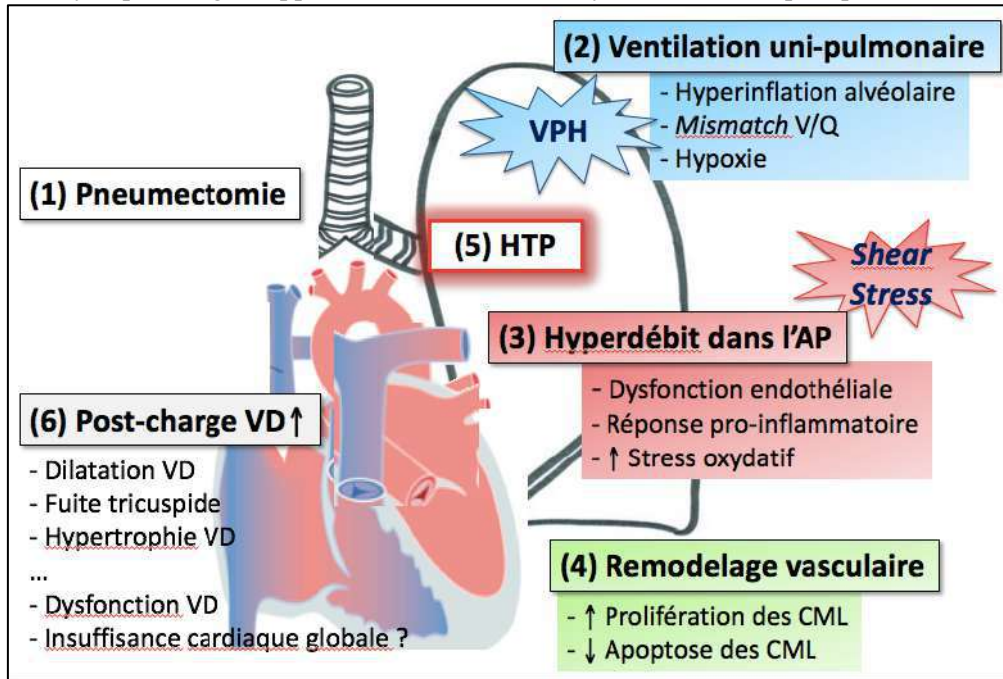
La dysfonction endothéliale est la clef de voute du remodelage vasculaire pulmonaire dans l'hypertension pulmonaire [42]. Après pneumonectomie, l'endothélium agressé augmente la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire et favorise la survenue de l'œdème pulmonaire observé après la chirurgie [1]. Cet œdème signe l'incapacité du réseau vasculaire pulmonaire à absorber l'*overflow* brutal dans le poumon restant. Cela implique aussi que l'HTP et l'œdème postopératoire dépendent du réseau vasculaire pulmonaire controlatéral à la résection, de sa quantité (surface de section) [43], mais également de sa qualité de distension et de recrutement permettant de faire face à une augmentation de débit.

L'hyperdébit affecte la fonction paracrine de l'endothélium et déséquilibre la balance vasoconstriction – vasodilatation en faveur de la constriction et de la balance prolifération – apoptose en faveur de la prolifération. Ce « *cross-talk* », par la mise en jeu de voies de signalisation anti-apoptotiques et pro-prolifératives des cellules musculaires lisses (CML), aboutit à un remodelage vasculaire pulmonaire [42,44–46].

L'épaississement de la média des artères pulmonaires distales augmente la PAP et la post-charge pour le VD qui s'hypertrophie et se dilate [33]. Le remodelage du cœur droit est bénéfique d'une part car il permet de compenser l'élévation de post-charge, mais est aussi délétère car il fait le lit de la dysfonction diastolique et systolique du VD, qui, à terme, peut conduire à une insuffisance cardiaque globale.

Les conséquences de la pneumonectomie sur le cœur droit seront abordées au Paragraphe I. 4 ci-après.

Figure 1.3.4. Physiopathologie supposée de l'HTP et de la dysfonction VD après pneumectomie.



AP : artère pulmonaire ; V/Q : rapport ventilation sur perfusion ; CML : cellule musculaire lisse ; VD : ventricule droit ; HTP : hypertension pulmonaire ; VPH : vasoconstriction pulmonaire hypoxique.

I. 3. 5. Autres modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire liée à un hyperdébit

Le débit sanguin altéré (ou « *disturbed blood flow* ») peut se produire naturellement dans des régions spécifiques du système vasculaire, par exemple, les points de ramification, ou en raison de modifications pathologiques de la géométrie vasculaire (sténose ou obstruction des vaisseaux), ou de forces hémodynamiques. Dans des conditions physiopathologiques, ces changements peuvent conduire à des réponses vasculaires et cellulaires spécifiques, le « *shear stress* », entraînant un remodelage de la paroi vasculaire [47].

Par exemple, dans certaines cardiopathies congénitales, le shunt systémique vers la circulation pulmonaire est à l'origine d'une augmentation du flux sanguin pulmonaire relativement au flux sanguin systémique. Cet hyper-débit dans le réseau artériel pulmonaire est considéré comme un déclencheur essentiel de l'apparition de lésions néointimales et du développement de l'HTP dans ce type de pathologies.

Certains chercheurs ont essayé de « modéliser » cette pathologie. Le modèle le plus décrit pour modéliser l'hyper-débit est le shunt aorto-pulmonaire, créant une anastomose entre l'aorte (à haute pression) et l'artère pulmonaire (à basse pression). Chez l'homme, cette intervention est encore indiquée dans le traitement de certaines formes de cardiopathie congénitale, et porte le nom de ses inventeurs, la chirurgie de *Blalock*, ou la chirurgie de *Pott*. Dans les modèles expérimentaux, le shunt aorto-pulmonaire augmente nettement le débit de manière unilatérale dans l'une des deux branches artérielles pulmonaires, et est associé à un remodelage vasculaire pulmonaire sévère unilatéral, du côté du shunt [48]. Une autre particularité du remodelage dans ce type d'hypertension pulmonaire est sa réversibilité après correction de l'hyperdébit. Dans l'étude de Mercier *et al.*, un shunt aorto-pulmonaire était créée chez le cochon, et une HTP et un remodelage hyper-prolifératif étaient observés 5 semaines après la chirurgie. L'HTP était associée à une surexpression de l'endothéline-1, du récepteur ETA, et de l'angiopoïétine. Cinq semaines après la fermeture de ce shunt, la PAP comme la muscularisation des artères pulmonaires distales étaient revenues à des valeurs normales [44]. Le même phénomène de « *reverse remodeling* » est observé chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire post-embolique (CTEPH, *chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension*) après thrombo-endarteriectomie pulmonaire [49], un traitement chirurgical qui a révolutionné le pronostic dans cette pathologie.

Les traitements vasodilatateurs indiqués dans l'HTAP idiopathique ont été essayés dans ces modèles expérimentaux d'hyper-débit, avec des effets bénéfiques observés après un traitement préventif par antagoniste des récepteurs de l'endothéline [50], inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 [51], prostacycline et NO inhalé [52]. Cela constituait des arguments pour tester certains de ces traitements dans notre modèle expérimental de pneumonectomie droite.

I. 4. REMODELAGE DU VENTRICULE DROIT ET DYSFONCTION CARDIAQUE DROITE APRES PNEUMONECTOMIE

Nous allons présenter dans cette section une revue détaillée de la littérature sur la dysfonction ventriculaire droite après résection pulmonaire. Avant cela, nous allons rappeler les outils d'évaluation de la fonction cardiaque droite, introduire la notion de *strain* du VD, et décrire les grands principes du remodelage d'un VD faisant face à une augmentation de sa post-charge.

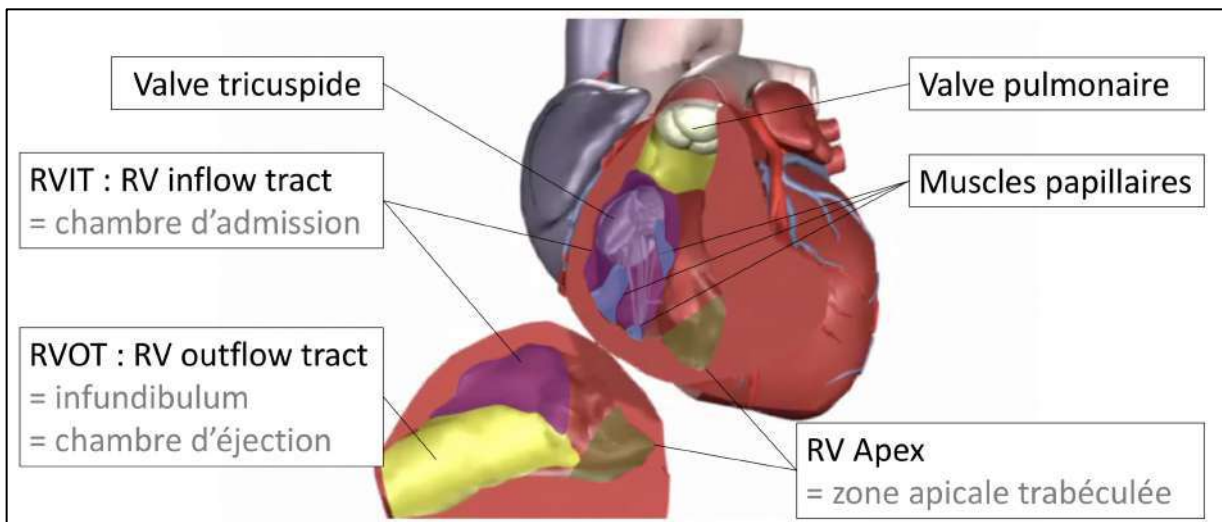
I. 4. 1. Les outils d'évaluation de la fonction cardiaque droite

I. 4. 1. 1. Rappels anatomiques

Le ventricule droit a une forme triangulaire, en forme de croissant, et est composé de 3 parties : la chambre d'admission, l'apex, la chambre d'éjection (Figure I.4.1.1). Du fait de cette anatomie tridimensionnelle particulière, son étude est souvent difficile. La circulation pulmonaire est un système à haut débit et faible pression. Les parois du VD sont en conséquence moins épaisses que celles du VG. La masse du VD est égale à $\frac{1}{4}$ de la masse VG. Le volume du VD est fortement sensible à l'augmentation de post-charge.

L'évaluation échographique du VD est décrite en détail dans les recommandations européennes publiées par la Société Américaine d'Echocardiographie en 2010 [53].

Figure I.4.1.1. Représentation schématique tridimensionnelle d'un ventricule droit sectionné longitudinalement.



I. 4. 1. 2. L'analyse morphométrique

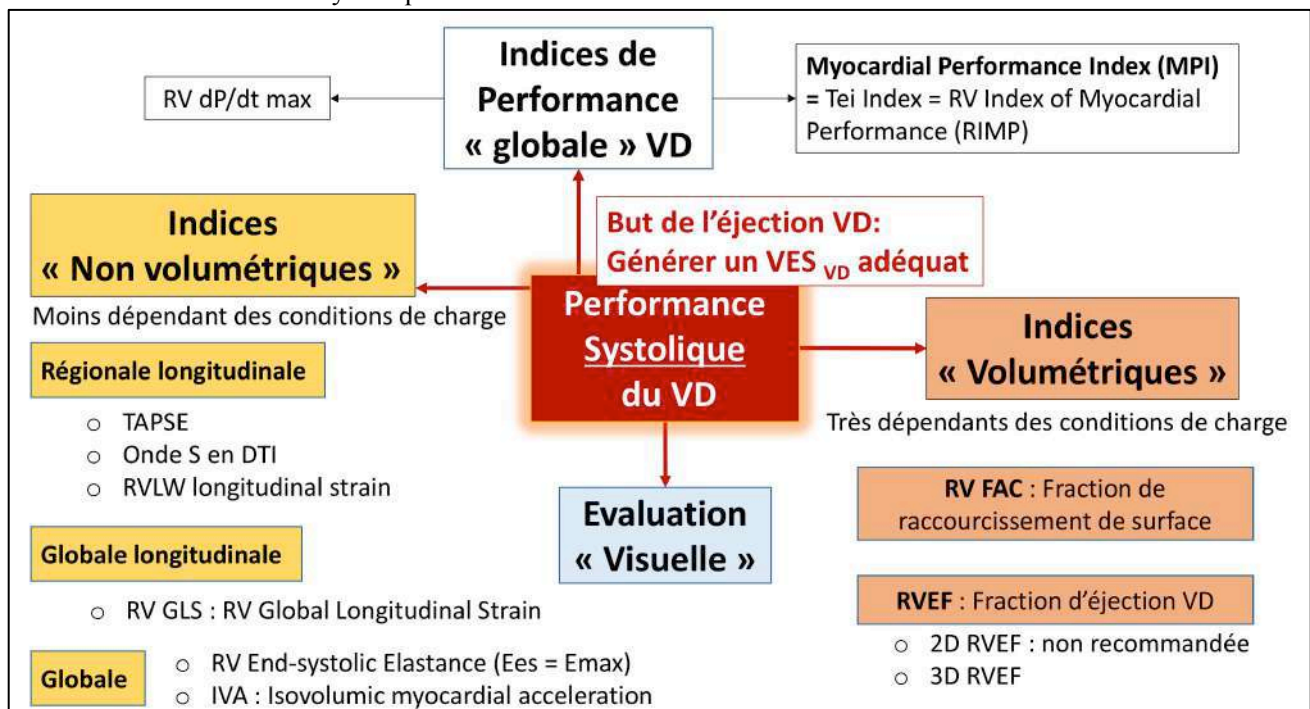
L'analyse du VD est d'abord morphométrique, avec la mesure des diamètres ventriculaires, aires télé-diastoliques, télé-systoliques, et si possible l'estimation des volumes ventriculaires. L'hypertrophie du VD

est définie chez l'homme par une épaisseur de la paroi libre (appelée aussi paroi latérale) du VD supérieure à 5 mm. Le VD s'analyse aussi par ses rapports avec le VG. Ainsi, un rapport VD/VG élevé est souvent le reflet d'une surcharge en volume ou en pression. L'analyse des mouvements du septum inter-ventriculaire renseigne sur les rapports de pressions entre les deux ventricules. Ainsi, un septum aplati en meso-systole témoigne souvent d'une surcharge de volume (communication inter-atriale ou insuffisance tricuspидienne), alors qu'un septum aplati en systole et en diastole signe une surcharge de pression, comme on peut le voir dans l'HTP. L'interdépendance VD-VG doit également s'évaluer par son retentissement sur le VG : mesure des dimensions du VG, de l'index d'excentricité du VG, de la fonction diastolique et systolique du VG, et du débit cardiaque gauche.

I. 4. 1. 3. L'analyse de la fonction systolique du VD

L'étude de la fonction systolique du VD en échocardiographie fait souvent appel à une approche multiparamétrique. La cinétique segmentaire de la paroi latérale, de la paroi antérieure et inférieure, et du septum inter-ventriculaire doit faire l'objet d'une analyse fine. Il existe de nombreux « indices » de fonction systolique, avec chacun ses avantages et ses inconvénients (Figure I.4.1.3).

Figure I.4.1.3. Représentation schématique des outils échographiques, et non échographiques, permettant l'évaluation de la fonction systolique du ventricule droit.



RV : right ventricule ; VD : ventricule droit ; dP/dt : variation de pression sur variation de temps ; VES : volume d'éjection systolique ; RVLW : right ventricle lateral wall ; TAPSE : tricuspid annular plane systolic excursion.

La mesure du TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*) et de la vélocité maximale de l'onde S en Doppler tissulaire à l'anneau tricuspide sont des mesures faciles à réaliser, reflètent bien la contractilité segmentaire à l'anneau, mais pas la fonction globale du VD. D'autre part, ils sont « angle-dépendants », c'est-à-dire que leur valeur est fortement influencée par l'alignement du faisceau d'ultrasons avec la structure anatomique étudiée.

La fraction de raccourcissement de surface {*RV-FAC* pour *fractional area change* = (STD-STS)/STD} est basée sur une vision uniquement bidimensionnelle du VD et néglige la participation de l'infundibulum à la contraction [53]. C'est pour cette raison que le calcul de la fraction d'éjection du VD n'est pas recommandé sur les vues bidimensionnelles.

L'indice de performance myocardique de Tei {*MPI* = (a-b)/b ; a = temps entre 2 diastoles, b = temps d'éjection} est peu utilisé en pratique car soumis lui aussi à de nombreuses limites.

Tous ces indices sont dépendants des conditions de charge [54], détaillées dans le paragraphe suivant. Les nouveaux logiciels embarqués sur les machines d'échographie ou installés sur les consoles d'analyse post-traitement (comme le logiciel *TomTec 4D RV Function 2.0™*) permettent une modélisation tridimensionnelle du VD et l'estimation des volumes ventriculaires, avec la mesure de la fraction d'éjection du VD (FEVD).

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) cardiaque est devenue l'examen de référence pour l'évaluation des volumes et de la fonction VD. L'IRM est moins « opérateur-dépendant » que l'échographie. Seulement, cet examen est encore peu disponible, coûteux, long à réaliser et à interpréter, et non adapté dans le contexte de l'urgence ou de la réanimation.

1. 4. 1. 4. L'évaluation des conditions de charge du VD

L'analyse de la fonction systolique et des volumes VD doit toujours être associée à une évaluation de la pré-charge et de la post-charge du VD.

La pré-charge du VD est évaluée par la taille de l'oreillette droite (dont le volume peut également être mesuré en 3D), par l'enregistrement du flux tricuspide en Doppler pulsé, et par le Doppler tissulaire à l'anneau tricuspide, qui renseignent aussi sur la fonction diastolique du VD. La pression de l'OD (POD) est estimée en échographie à partir du diamètre de la veine cave inférieure et de son degré de collapsibilité.

La post-charge du VD est constituée exclusivement par la PAP, en l'absence de sténose sur la valve pulmonaire. En échographie, la PAP est estimée soit à partir du flux d'insuffisance pulmonaire par la détermination du gradient VD-AP (en l'absence de valvulopathie pulmonaire), soit à partir du flux d'insuffisance tricuspide (IT) et le gradient OD-VD (en l'absence d'IT laminaire).

$$\boxed{\text{PAP systolique (mmHg)} = 4 \cdot (\text{IT v}_{\text{max}})^2 + \text{POD (mmHg)}}$$

Comme les autres paramètres, ces marqueurs sont imparfaits. Par exemple, le flux d'IT n'est présent que chez 75% des patients ayant une HTP. D'autres paramètres s'altèrent dans l'HTP, comme le temps d'accélération du flux d'éjection pulmonaire qui se raccourcit, ou le diamètre de l'AP qui se dilate. Concernant ce dernier point, une étude récente a montré que les patients opérés de résection pulmonaire, ayant un diamètre de l'AP dilaté en préopératoire, étaient plus à risque de développer une complication cardio-respiratoire postopératoire [55].

La post-charge du VD, donc l'HTP, s'évalue aussi par son retentissement sur la morphologie des cavités ventriculaires droites. Dans l'HTP aigue, le VD a tendance à se dilater pour faire face à l'élévation de sa post-charge. Dans l'HTP chronique, le remodelage associe en général la dilatation à une hypertrophie du VD.

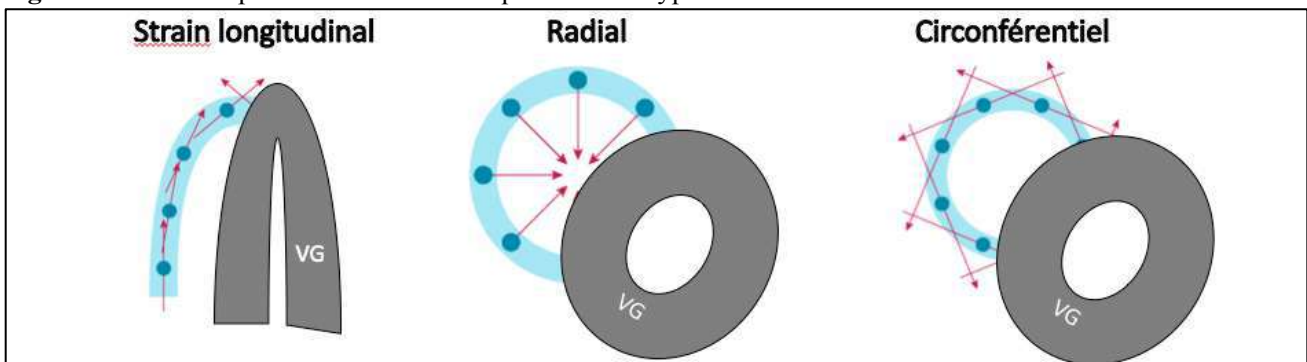
La méthode de référence pour l'évaluation des conditions de charge reste le cathétérisme artériel pulmonaire. Seulement, il s'agit d'un examen invasif associé à des effets indésirables rares mais graves, et dont la réalisation ne pourrait être systématique chez les patients opérés du poumon.

1. 4. 1. 5. Le 2D-strain : un nouvel outil d'évaluation échographique de la fonction VD

En échographie, le 2D-strain est un outil d'analyse de la contractilité segmentaire et globale des cavités cardiaques, basé sur la cinétique des *speckle*, le *speckle-tracking*. Le 2D-strain a d'abord été décrit pour le VG avant d'être étudié dans les pathologies du VD. Dans les parois ventriculaires, il existe 3 types de *strain*, le *strain* radial, longitudinal et circonférentiel (Figure I.4.1.5.1).

Dans le VD, les fibres myocardiques longitudinales sont prédominantes, l'analyse de la contraction longitudinale est donc bien plus pertinente que la contraction radiale. La plupart des publications ont étudié le strain longitudinal, et nous ne parlerons quasi-exclusivement que du strain longitudinal dans ce document. Le 2D-strain longitudinal étudie un raccourcissement, toutes ses valeurs sont donc négatives (exemple : - 30%). Dans certaines publications, les valeurs de strain sont présentées en valeur absolue pour une analyse statistique plus aisée ($|- 30\%| = 30\%$).

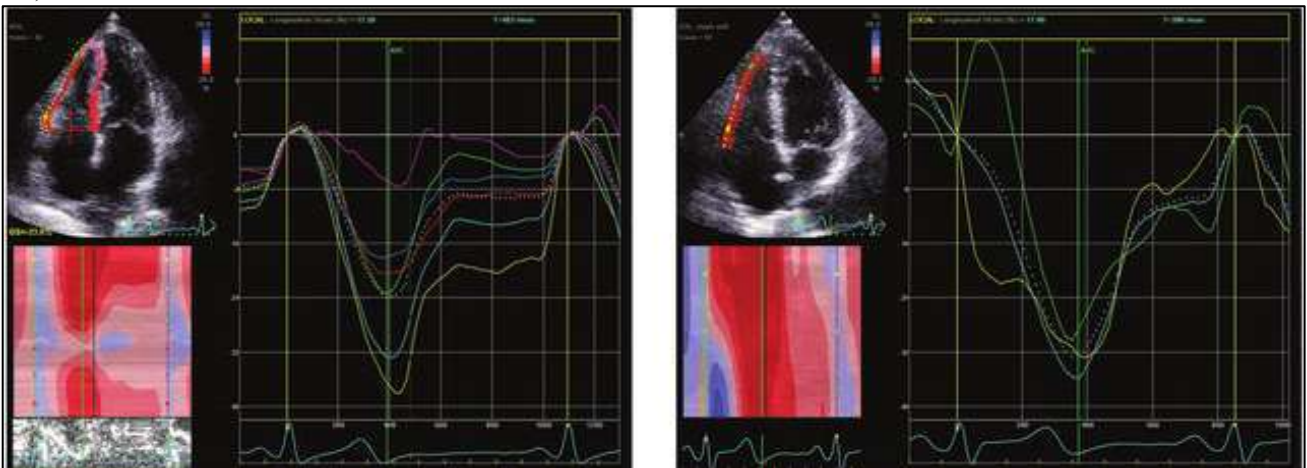
Figure I.4.1.5.1. Représentation schématique des trois types de 2-strain du ventricule droit.



Les avantages de cet outil sont multiples: il s'agit d'un paramètre angle -indépendant, qui permet une analyse segmentaire et globale de la fonction systolique du ventricule, et qui a une bonne valeur pronostique dans les maladies cardiaques. Par exemple, dans l'insuffisance cardiaque gauche, avec ou sans altération de la FEVG, l'altération du strain longitudinal global du VG est un marqueur fiable et corrélé à la mortalité [56].

Pour le ventricule droit, on distingue le strain longitudinal global du VD, qui inclue la contraction du septum (donc VG-dépendant), et le strain longitudinal de la paroi libre du VD (Figure I.4.1.5.2). Dans l'hypertension pulmonaire, l'altération du 2D-strain de la paroi libre du VD a une bonne valeur pronostique [57,58]. Les valeurs normales sont de -30% et dépendent du constructeur du logiciel. Une valeur inférieure à -20% (ou supérieure à 20% en valeur absolue) est considérée comme normale, alors qu'une valeur supérieure à -15% (ou inférieure à 15% en valeur absolue) est toujours pathologique.

Figure I.4.1.5.2. Etude échocardiographique chez l'homme : exemple de calcul du 2D-strain longitudinal global du ventricule droit (*global longitudinal strain*, GLS, à gauche), et du 2D-strain longitudinal de la paroi libre du VD (à droite), à l'aide d'un logiciel (General Electric®, Automated Function Imaging™ 2.0).



I. 4. 2. Remodelage du VD et fonction cardiaque droite dans l'hypertension pulmonaire chronique

Le remodelage du VD dans l'hypertension pulmonaire chronique expérimentale est très bien décrit par Guihaire *et al.* dans sa Thèse [59,60]. L'adaptation du VD dépend du caractère aigu ou chronique du stress qui lui est imposé. On distingue deux types de stress, la surcharge en volume et la surcharge en pression. D'une manière générale, le VD s'adapte mieux à une surcharge de volume qu'à une surcharge de pression en raison de sa faible masse et de sa grande compliance. De même, il tolère mieux une variation chronique de ses conditions de charge qu'un stress aigu. Les surcharges de volume observées dans l'insuffisance tricuspide et les communications inter-atriales sont ainsi longtemps compensées, tandis que l'HTP même

modérée, va modifier précocement la géométrie puis la fonction du VD. Dans l'HTP chronique, le VD s'hypertrophie à un stade initial de la maladie afin de maintenir le débit cardiaque. L'augmentation de pression télé-systolique ventriculaire droite s'accompagne le plus souvent d'une augmentation du volume télé-systolique, résultant en une diminution modérée de la fraction d'éjection du VD. Cependant, cette hypertrophie compensatrice peut aboutir à l'ischémie du VD, puis à l'insuffisance ventriculaire droite. A un stade avancé de l'HTP, lorsque les RVP et le stress pariétal continuent d'augmenter, le VD se dilate selon la loi de Laplace. Comparativement aux pathologies du cœur gauche, le VD se dilate plus précocement en réponse à la surcharge de pression. D'un point de vue fonctionnel, plus les RVP augmentent et plus le découplage entre le VD et la circulation pulmonaire s'aggrave, conduisant à terme à l'insuffisance cardiaque droite.

I. 4. 3. Remodelage du VD et fonction cardiaque droite après pneumonectomie

I. 4. 3. 1. Revue de la littérature chez l'homme

Après pneumonectomie, nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'HTP était inconstante et pouvait rester asymptomatique, ou bien favoriser ou être associée à la survenue de complications cardiovasculaires (Figure I.2.3). Les résultats des modèles expérimentaux et les études diagnostiques menées chez l'homme concordent pour affirmer que la pneumonectomie induit un remodelage cardiaque droit de type dilatation et hypertrophie, associé à une dysfonction systolique du VD, dès la période postopératoire précoce, avec des effets maintenus à long-terme plusieurs années après la chirurgie.

Sur le plan physiopathologique, la réduction de moitié du lit vasculaire pulmonaire après pneumonectomie augmente inévitablement la post-charge pour le ventricule droit, ce qui peut conduire à une dilatation du ventricule droit [41,61–63]. Dans la littérature, même si le retentissement de la pneumonectomie sur la fonction systolique du VD a pu faire l'objet de controverses [36], les résultats de plusieurs études sont concordants et démontrent une diminution postopératoire de la fonction systolique du VD, évaluée principalement par la fraction d'éjection du VD [40,41,61,63].

Dans l'étude de Kowalewski *et al.* [61], une dilatation et une dysfonction VD était observée par échocardiographie précocement (J2) après pneumonectomie. Le volume télé-diastolique du VD indexé augmentait de manière significative chez les patients après pneumonectomie, 80 ± 7 vs 66 ± 5 ml/m² en préopératoire, et la fraction d'éjection du VD (RVEF, *RV ejection fraction*) diminuait de 48 ± 5 à $39 \pm 4\%$ respectivement.

Quelques années plus tard, Elrakhawi *et al.* confirmaient ces résultats en évaluant par cathétérisme artériel pulmonaire 142 patients opérés de lobectomie et 36 patients opérés d'une pneumonectomie, suivis pendant 48 heures après la chirurgie [63]. La PAPm à J2 était élevée dans les deux groupes, à 25 ± 7 et 33 ± 6

mmHg respectivement, et était associée à une diminution de RVEF à 42 ± 8 et 37 ± 9 % et à une dilatation du VD dans les deux groupes, plus importante après pneumonectomie.

Ce remodelage et cette dysfonction systolique du VD semblent être prolongés dans le temps. Dans l'étude de Venuta *et al.* [62], les patients opérés d'une lobectomie ou d'une pneumonectomie étaient suivis pendant 4 ans. Les auteurs ont mis en évidence dans le groupe pneumonectomie une dilatation graduelle du VD parallèlement à une augmentation progressive de PAP systolique.

Dans l'étude récemment publiée en 2019 par McCall *et al.* [41], la fonction VD était évaluée par la technique de référence, à savoir l'IRM cardiaque (*cardiac magnetic resonance imaging*), apportant des informations robustes et incontestables. Les auteurs ont réalisé une IRM cardiaque en préopératoire, puis deux jours et deux mois après une chirurgie de résection pulmonaire chez 28 patients. Même si la population de cette étude était constituée principalement de patients opérés d'une lobectomie (n = 23 lobectomie, n = 4 bilobectomie, n = 1 pneumonectomie), les auteurs ont montré avec une technique d'imagerie « *gold-standard* », une diminution de RVEF de 51 ± 7 à 46 ± 6 % deux mois après la résection, associée à une dilatation du VD aux dépens du VG (avec respectivement une augmentation du RVEDV et diminution du LVEDV à 2 mois). Dans cette étude, la dilatation des cavités droites n'avait pas de retentissement sur la fonction cardiaque gauche.

Du fait de l'interdépendance VD-VG, il est bien admis qu'une dilatation ou un remodelage important du VD peuvent altérer la fonction cardiaque gauche [64]. Dans une étude récente, publiée par Wang *et al.* en 2015, la fraction d'éjection du VG (LVEF, *left ventricular ejection fraction*) était légèrement diminuée après résection pulmonaire majeure, mais restait dans des valeurs normales [65]. Les données concernant le retentissement gauche de la dysfonction droite sont plus contrastées dans la littérature. L'étude d'Okada *et al.*, ne retrouvait pas de dysfonction gauche après résection pulmonaire, ni au repos, ni à l'effort [40].

1. 4. 3. 2. Retentissement clinique de la dysfonction VD postopératoire

Dans la littérature, il y a beaucoup moins de données concernant le retentissement clinique de la dysfonction VD postopératoire que sur les altérations retrouvées à l'imagerie après chirurgie pulmonaire. Le retentissement clinique de cette dysfonction VD est encore peu étudié.

D'abord, il est clair que la dysfonction VD peut rester parfaitement asymptomatique, au repos comme à l'effort (Figure I.4.3.2). Dans cette catégorie de patients, un suivi régulier clinique et des paramètres de fonction VD paraît requis pour détecter une éventuelle aggravation. A notre connaissance, ce suivi régulier de la fonction VD et de la capacité cardio-pulmonaire à l'exercice ne fait actuellement pas partie des recommandations concernant le suivi postopératoire après chirurgie de résection carcinologique.

A l'effort, l'organisme nécessite une multiplication du débit cardiaque jusqu'à un facteur 5 chez les sportifs de haut niveau. Les ventricules doivent impérativement faire face à cette augmentation des besoins

en oxygène, ce qui constitue pour eux un « challenge ». Ainsi, la dysfonction VD se manifeste dans certains cas uniquement à l'exercice physique, entraînant une intolérance à l'effort. Ce paramètre de « tolérance à l'effort » est d'une importance cruciale. En effet, c'est un excellent reflet de la qualité de vie des patients. D'autre part, il est important de proposer aux patients des options thérapeutiques avant la survenue de symptômes au repos.

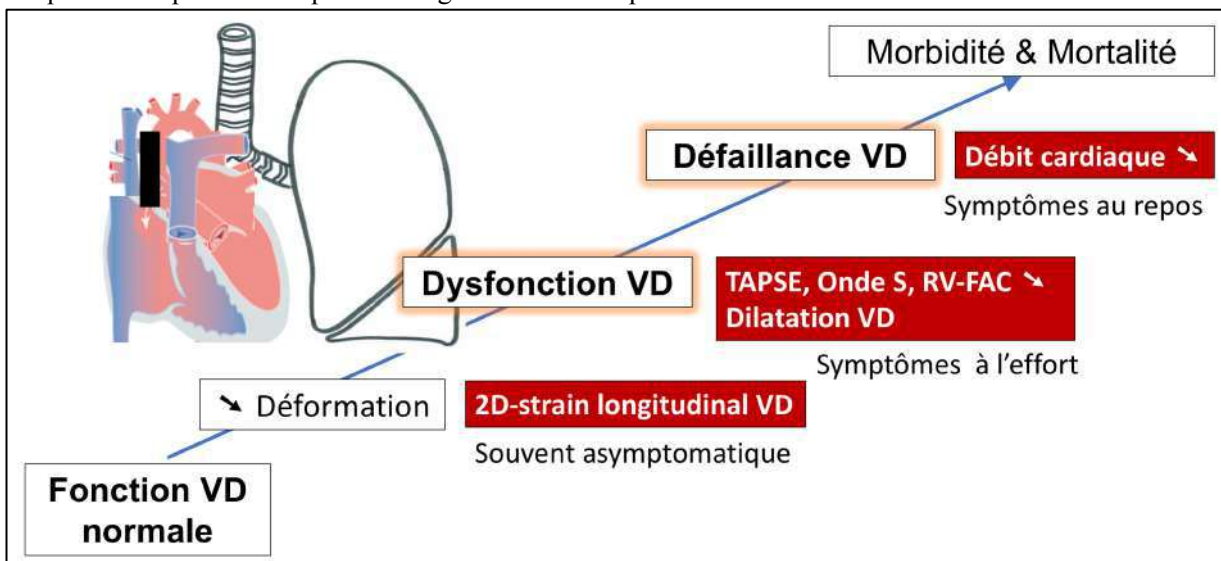
La tolérance à l'effort est peu étudiée après chirurgie de résection pulmonaire majeure, alors qu'elle est bien décrite dans l'évaluation préopératoire du patient, et corrélée au pronostic postopératoire [66,67]. De même, dans l'HTAP idiopathique, la tolérance à l'effort est maintenant un outil diagnostique et de suivi incontournable, également corrélé au pronostic des patients à long-terme [68].

A notre connaissance, il n'y a qu'une seule étude sur le sujet. Dans l'étude d'Okada *et al.*, présentée au Paragraphe I.3.3.2 (Figure I.3.3.2), les auteurs décrivaient une majoration de la PAP à l'effort, mais sans que soit associée une détérioration de la fraction d'éjection du VD [40].

Enfin, la dysfonction VD peut avoir des conséquences rythmiques. Plusieurs études ont montré qu'une HTP ou une dysfonction VD après résection pulmonaire favorisait les troubles du rythme supra-ventriculaires [69–71,61], augmentant par ce biais la durée d'hospitalisation et la morbi-mortalité postopératoire.

Nous pensons que le 2D-strain longitudinal du VD, dont l'utilité est maintenant validée dans l'HTAP idiopathique [57,58], pourrait être un marqueur utile dans l'évaluation de la dysfonction VD après résection pulmonaire.

Figure I.4.3.2. Evolution chronologique supposée de la dysfonction VD, des altérations échographiques et cliniques correspondantes après chirurgie de résection pulmonaire.



VD : ventricule droit ; TAPSE : tricuspid annular plane systolic excursion ; RV-FAC : right ventricle fractional area change.

I. 4. 3. 3. Le 2D-strain du VD après chirurgie de résection pulmonaire : un nouveau paramètre à étudier

Le 2D-strain longitudinal du VD, dont l'intérêt est validé dans l'HTAP idiopathique [57,58], pourrait être un marqueur plus sensible, plus précoce, plus facile à mesurer, et moins influencé par les conditions de charge que les indices classiques de fonction systolique du VD.

Au moment où s'est construit notre protocole de recherche RESECHO et déposé sur le site *clinical trials* [3], en 2015-2016, aucune étude n'était publiée ni même en cours sur ce sujet. La problématique du 2D-strain longitudinal du VD en postopératoire de chirurgie de résection pulmonaire était vierge.

Depuis, seulement deux études sont parues sur ce sujet. Dans l'étude publiée par Wang *et al.* en 2016, le RVLW 2D-strain diminuait de $-31 \pm 6\%$ en préopératoire à $-12 \pm 4\%$ en postopératoire chez les patients opérés d'une pneumonectomie ($n = 10$), et passait de $-30 \pm 6\%$ à $-18 \pm 8\%$ chez ceux opérés d'une lobectomie ($n = 20$) [65]. Le 2D-strain global du VD suivait la même évolution. Les auteurs décrivaient également les variations de 2D-strain radial et circonférentiel.

Le second article est publié en 2017 par une équipe indienne, Bhat *et al.*, dans une revue non indexée dans PubMed (*Journal of Perioperative Echocardiography*) [72]. Dans cette étude portant sur 32 patients, majoritairement opérés d'une lobectomie (80%), les patients étaient évalués en échocardiographie en préopératoire et à J2. Le 2D-strain global du VD s'altérait en postopératoire, passant de -19 ± 5 (préopératoire) à $-15 \pm 4\%$ (J2), sans différence entre lobectomie et pneumonectomie, et restait altéré à J7 et J30.

Ces données nous semblent insuffisantes pour déterminer l'intérêt du 2D-strain longitudinal du VD en postopératoire de chirurgie pulmonaire. En effet, dans ces deux publications, le 2D-strain était étudié comme un paramètre échographique isolé, sans être corrélé aux autres indices de fonction systolique du VD, ni aux événements cliniques postopératoires, ni au devenir à long-terme.

I. 4. 3. 4. Conclusion pour les parties I.3 et I.4

Nous avons vu que l'hypertension pulmonaire, le remodelage VD, et la dysfonction VD sont bien décrits dans la littérature. En revanche, chose plus surprenante, aucune étude « thérapeutique » n'a essayé de prévenir ce remodelage cardio-pulmonaire après résection pulmonaire, ni chez l'homme, ni même en recherche expérimentale.

I. 5. PISTES THERAPEUTIQUES POUR PREVENIR L'HYPERTENSION PULMONAIRE POST-PNEUMONECTOMIE

Dans la littérature, alors que le remodelage cardio-pulmonaire après résection pulmonaire majeure est bien décrit, aucune étude ne s'est intéressée à prévenir le développement de l'hypertension pulmonaire après résection même. En l'état actuel des connaissances, nous ne disposons d'aucun traitement permettant de prévenir cette complication.

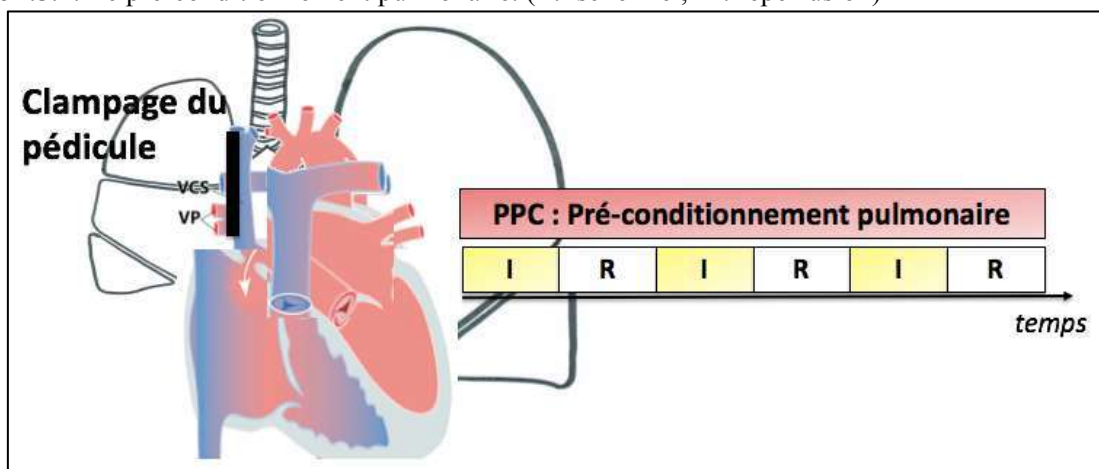
I. 5. 1. Une hypothèse « exotique » : le pré-conditionnement pulmonaire

Le pré-conditionnement (PC) est un puissant mécanisme de protection tissulaire endogène ubiquitaire et pourrait être une piste thérapeutique dans cette pathologie.

Le PC ischémique cardiaque correspond à de courtes périodes d'interruption de la perfusion coronaire qui augmentent la tolérance du cœur soumis ultérieurement à une ischémie prolongée [73]. En chirurgie cardiaque, il diminue la réponse oxydative et l'apoptose des cardiomyocytes liées au phénomène d'ischémie-reperfusion, et améliore le pronostic post-opératoire [74–77]. Il procure deux fenêtres de protection : l'une précoce démarrant presque immédiatement après le stimulus déclenchant et durant 1 à 2 heures, et l'autre tardive démarrant 24 heures après le stimulus déclenchant et persistant 24 à 72 heures [78]. Après infarctus du myocarde, le post-conditionnement a été testé avec des résultats prometteurs [79].

Le PC ischémique « *remote* » (RIPC), correspond à l'ischémie – reperfusion intermittente d'un membre au brassard, à distance de la zone à protéger. Chez l'homme, le RIPC a été particulièrement étudié en prévention des complications majeures après chirurgie cardiaque ou vasculaire, et pourrait s'appliquer à la chirurgie carcinologique pulmonaire [80–82].

Figure I.5.1. Le pré-conditionnement pulmonaire. (I : ischémie ; R : reperfusion)



VCS : veine cave supérieure ; VP : veines pulmonaires

Le PC pulmonaire (« *pulmonary pre-conditioning* », PPC) n'a jamais été étudié. Il s'agit de clamper de façon intermittente le pédicule pulmonaire, afin « d'habituer » l'appareil cardio-pulmonaire à fonctionner sur un seul poumon (Figure I.5.1). Le PPC pourrait avoir un effet bénéfique par deux mécanismes différents: (1) l'ischémie pulmonaire induite par le clampage, qui exercerait des effets sur le poumon controlatéral [28], probablement par sécrétion de médiateurs dans la circulation bronchique ; (2) la ventilation uni-pulmonaire, induite par le clampage, permettrait « d'habituer » le poumon controlatéral à la surdistension alvéolaire et à l'élévation du débit sanguin.

A notre connaissance, aucune étude expérimentale ou clinique n'a évalué le PPC.

I. 5. 2. Une hypothèse « classique » : les traitements vasodilatateurs pulmonaires validés dans l'HTAP idiopathique pourraient prévenir l'HTP post-pneumectomie

Les trois classes de traitements recommandées dans le traitement de l'HTAP idiopathique (inhibiteurs de la voie du NO, antagonistes des récepteurs de l'endothéline 1, et analogues des prostacyclines) (Figure I.5.2) n'ont jamais été testées après pneumectomie, chez l'homme comme chez l'animal. Dans l'HTAP idiopathique, ces traitements permettent de diminuer la PAPm, les symptômes au repos, et d'améliorer la tolérance à l'effort, la qualité de vie et le pronostic fonctionnel des patients [83]. Dans des modèles expérimentaux d'hyperdébit autres que la pneumectomie, certains de ces traitements ont également été testés avec succès (cf. Paragraphe I.3.5), ce qui constitue un argument pour les essayer après pneumectomie.

Notre hypothèse principale était que les traitements vasodilatateurs pulmonaires validés dans l'HTAP idiopathique pouvaient prévenir le développement de l'HTP et de la dysfonction VD après pneumectomie droite, dans un modèle expérimental chez le rat.

Les molécules que nous voulions tester étaient celles disponibles par voie orale chez l'homme, le Sildénafil, un inhibiteur de phosphodiesterase de type 5, le Macitentan, un antagoniste de l'endothéline 1, et le Selexipag, un agoniste du récepteur à la prostacycline, chacune comparée à un placebo. Notre hypothèse était qu'un traitement vasodilatateur pulmonaire, administré après pneumectomie, inhibe au moins partiellement le remodelage vasculaire et le développement de l'HTP.

1. 5. 2. 1. Le Sildénafil

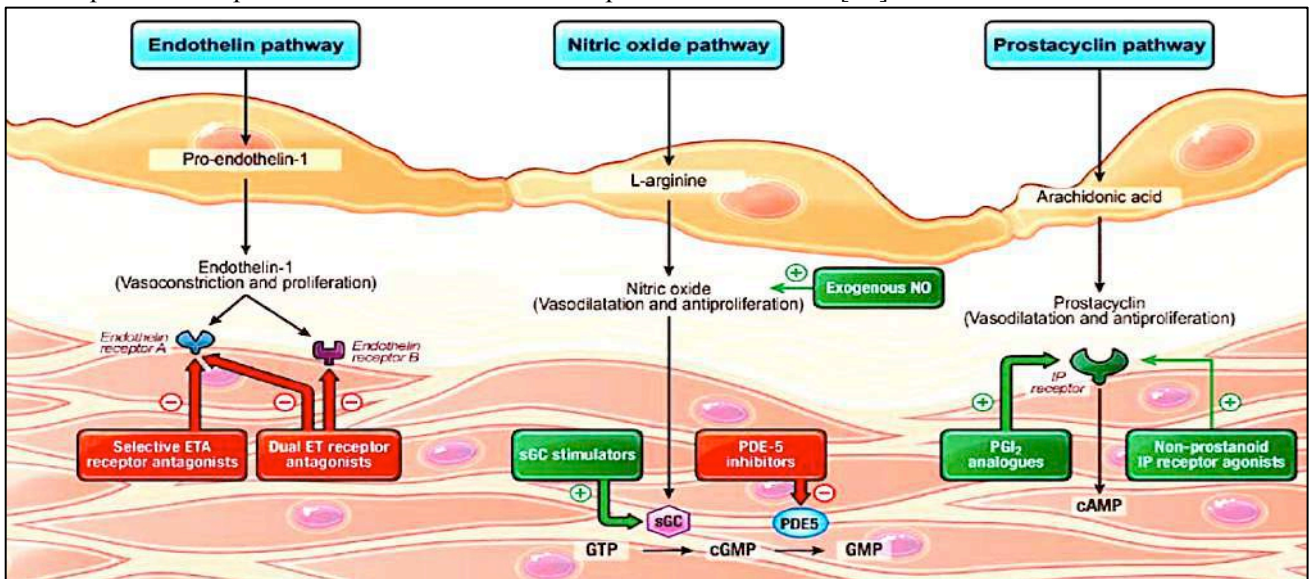
Le Sildénafil est un inhibiteur puissant et sélectif de la phosphodiesterase de type 5, disponible par voie orale. L'inhibition de l'enzyme de dégradation de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP), phosphodiesterase de type 5, entraîne une vasodilatation par la voie NO / cGMP au niveau des sites

exprimant cette enzyme. Étant donné que le système vasculaire pulmonaire contient des quantités substantielles de phosphodiesterase de type 5, les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 ont été particulièrement étudiés dans l'HTAP, où ils exerceraient également des effets antiprolifératifs [84].

Plusieurs essais cliniques randomisés chez des patients atteints d'HTAP traités par le sildénafil ont confirmé des résultats favorables sur la capacité à l'effort, les symptômes et l'hémodynamique [85–87]. La dose approuvée de Sildénafil est de 20 mg trois fois par jour. La plupart des effets secondaires du Sildénafil sont légers à modérés, et principalement liés à une vasodilatation (céphalées, bouffées de chaleur, épistaxis). Une injection parentérale est également réalisable dans certains cas particuliers [21].

Dans la littérature, nous n'avons trouvé qu'un seul cas clinique rapportant un traitement par Sildénafil après une pneumectomie gauche réalisée chez une patiente de 63 ans ayant développé une détresse respiratoire aiguë à J1 [88].

Figure I.5.2. Les trois voies vasomotrices principales (endothéline-1, oxyde nitrique et prostacycline) ciblées par les thérapies validées dans l'HTAP. D'après Humbert *et al.* [89].



1. 5. 2. 2. Le Macitentan

L'activation de la voie de l'endothéline-1 a été démontrée dans les tissus plasmatiques et pulmonaires des patients atteints d'HTAP. L'endothéline-1 exerce des effets vasoconstricteurs et mitogènes en se liant à deux isoformes de récepteurs distincts dans les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires, les récepteurs de l'endothéline-1 de type A et B.

Le Macitentan est un inhibiteur des récepteurs de type A et B de l'endothéline-1 (dual ERA, *dual endothelin receptor antagonist*), disponible par voie orale. Il a été évalué contre placebo dans un essai clinique (SERAPHIN) portant sur 742 patients atteints d'HTAP et traités pendant 100 semaines [90]. Le

critère principal était le temps écoulé entre le début du traitement et la première apparition d'un critère composite de décès, septostomie auriculaire, transplantation pulmonaire, début d'un traitement par voie parentérale ou aggravation de l'HTAP. Le Macitentan a réduit de manière significative ce critère composite de morbidité et de mortalité chez les patients atteints d'HTAP et a également augmenté la capacité à l'exercice. Les effets indésirables les plus fréquents sont les céphalées, l'anémie et les pharyngites [21].

1. 5. 2. 3. Le Selexipag

La prostacycline est produite principalement par les cellules endothéliales, et induit une puissante vasodilatation de tous les lits vasculaires. Ce composé est l'inhibiteur endogène le plus puissant de l'agrégation plaquettaire et semble également avoir des activités cytoprotectrices et antiprolifératives. Une dérégulation des voies métaboliques de la prostacycline a été mise en évidence chez des patients atteints d'HTAP, évaluée par une réduction de l'expression de la prostacycline synthase dans les artères pulmonaires. L'utilisation clinique de la prostacycline chez les patients atteints d'HTAP a été rendue possible par la synthèse d'analogues stables.

Le Selexipag est un agoniste sélectif du récepteur IP de la prostacycline, disponible par voie orale. Le Selexipag et son métabolite ont des modes d'action similaires à ceux de la prostacycline endogène (effet agoniste sur les récepteurs IP). Dans une étude pilote menée chez des patients atteints d'HTAP déjà sous traitement, le Selexipag réduisait les résistances vasculaires pulmonaires [91]. Dans l'étude GRIPHON menée chez 1156 patients, le Selexipag seul ou en bithérapie réduisait de 40% un critère composite de morbidité et de mortalité.

I. 5. 3. Une hypothèse « ciblée » : les facteurs de croissance

1. 5. 3. 1. Principaux facteurs de croissance impliqués dans l'HTAP

Bien que les traitements vasodilatateurs exposés ci-dessus aient en théorie un effet antiprolifératif théorique, les preuves directes de cet effet antiprolifératif manquent. De plus, l'utilisation de la plupart des agents vasodilatateurs est entravée soit par des effets indésirables, soit par des voies d'administration de médicament peu pratiques.

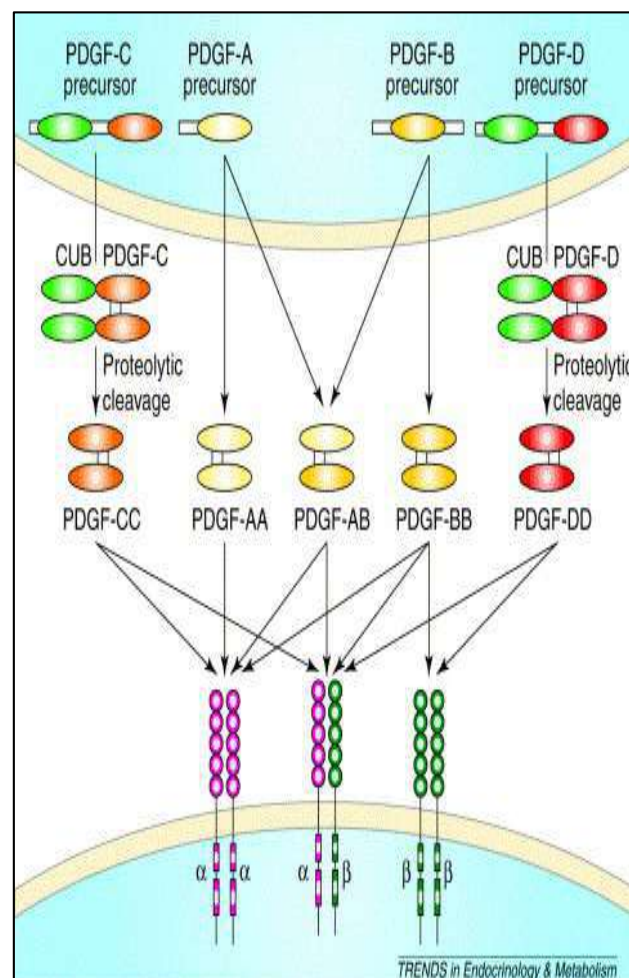
Plusieurs facteurs de croissance ont été mis en cause dans la physiopathologie de l'HTAP idiopathique, notamment dans la prolifération et la migration anormales des SMC. L'activation des voies de signalisation de ces facteurs de croissance serait à l'origine d'un déséquilibre de la balance prolifération / apoptose, conduisant à une prolifération excessive des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires et au remodelage vasculaire observé dans l'HTAP. Parmi les principaux facteurs de croissance identifiés comme potentiellement responsables dans l'HTAP, figurent l'EGF (*Epidermal growth factor*), le FGF2

(*Fibroblast growth factor*), et le PDGF (*Platelet-derived growth factor*) [92–94]. La protéine P130cas, impliquée dans la régulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire contrôlant la motilité, la prolifération et la survie des cellules [95], a été identifiée comme étant un effecteur commun à ces trois voies de signalisation [96]. Cette découverte a d'ailleurs alimenté l'hypothèse selon laquelle les cellules musculaires lisses dans l'HTAP ont un phénotype pseudo-cancéreux, thèse réfutée par la suite [2].

I. 5. 3. 2. Le PDGF comme cible thérapeutique privilégiée

Cinq isoformes du PDGF ont été identifiées, agissant sélectivement sur deux types de récepteurs, le PDGFR- α et β (Figure I.5.3.2). Les récepteurs PDGF (PDGFR) appartiennent à une famille de récepteurs transmembranaires, les récepteurs tyrosine kinases (RTK) et sont censés être maintenus ensemble par les ligands bivalents PDGF. Ce complexe de récepteur dimérique et de PDGF entraîne une autophosphorylation du RTK et une augmentation de l'activité des principales kinases intracellulaires (Ras/MAPK, PI3K, et phospholipase C).

Figure I.5.3.2. Les cinq isoformes du ligand PDGF (*platelet-derived growth factor*) et les récepteurs au PDGF (PDGF-R). Illustration d'après Mariani *et al.* [97].



Il y a de nombreuses évidences dans la littérature pour affirmer que le « *shear stress* » influe de façon privilégiée sur l'expression du PDGF et de son récepteur PDGF-R β pour induire la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires [98–102,28]. L'activation du PDGF-R α serait, quant à elle, plutôt protectrice vis-à-vis du remodelage vasculaire [100].

Dans l'étude de Sage *et al.*, l'expression du PDGF était augmentée dans le poumon controlatéral après pneumectomie droite chez le cochon, et encore plus élevée après ligature de l'artère pulmonaire droite [28]. L'augmentation de débit dans le poumon controlatéral était identique dans le modèle « pneumectomie » et dans le modèle « ligature de l'AP ». Pourtant l'HTP et le remodelage vasculaire n'étaient présents que dans le groupe « ligature de l'AP ». Les auteurs en ont conclu que l'ischémie du poumon droit était un mécanisme pathologique qui s'ajoutait aux effets pathogènes de l'hyperdébit, majorant la synthèse des facteurs de croissance pro-prolifératif.

Dans la séquence du promoteur du PDGF-B, à l'extrémité cis, il y a un facteur de transcription qui s'active lorsque la cellule est soumise au *shear stress* [99,103], le « *cis-acting fluid shear-stress-responsive element* » (SSRE). Ce site de liaison du facteur de transcription est également présent dans les promoteurs de certains autres gènes endothéliaux, comme l'activateur tissulaire du plasminogène, ICAM1 (*intercellular adhesion molecule*) et le TGF (*transforming growth factor*), dont l'induction est également influencée par une contrainte de cisaillement. Ainsi, l'expression du PDGF-B pourrait être *up-régulée*, du moins en partie, par des facteurs de transcription induits par un *shear stress* interagissant avec un élément promoteur commun.

1. 5. 3. 3. La nécessité de développer un inhibiteur sélectif du PDGF-receptor β

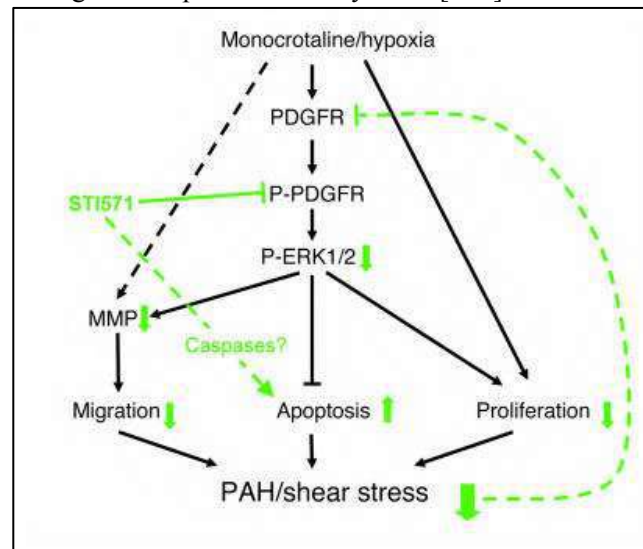
L'expérience (malheureuse) de l'Imatinib dans l'HTAP idiopathique

L'Imatinib (STI571 ou Glivec®), un inhibiteur non sélectif de la voie PDGF, était une piste thérapeutique prometteuse dans les modèles expérimentaux d'HTAP [104,105]. L'Imatinib a été conçu pour cibler le site de liaison à l'ATP des RTK (Figure I.5.3.3) et est un inhibiteur bien établi de la kinase BCR-ABL. Ce traitement est approuvé notamment dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique [106]. Seulement, les résultats de l'étude randomisée IMPRESS a montré que son utilisation dans l'HTAP chez l'homme était finalement délétère [107,108], probablement par ses mécanismes d'action non spécifiques et son effet sur les tyrosine kinases SRC et ABL.

La nécessité de cibler le récepteur PDGFR-béta

Dans l'HTP, seule l'isoforme BB et son récepteur β sont surexprimés dans le lit vasculaire pulmonaire et jouent un rôle clé [93,109]. Ainsi, nous avons testé un inhibiteur spécifique du PDGFR- β .

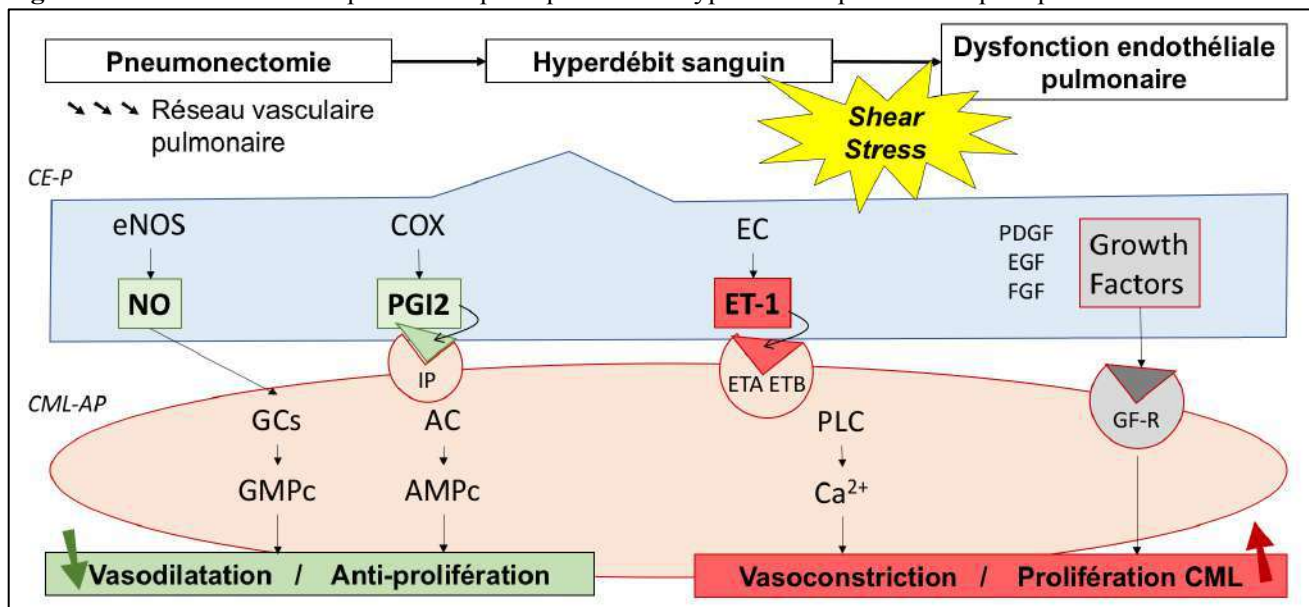
Figure I.5.3.3. Illustration schématique de l'impact de l'Imatinib (STI571) sur les voies de signalisation du PDGF impliquées dans le développement de l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline ou l'hypoxie chronique chez le rongeur. D'après Schermuly *et al.* [105].



I. 5. 4. Conclusion sur les pistes thérapeutiques médicamenteuses

Les différentes pistes thérapeutiques médicamenteuses que nous vous avons identifiées pour prévenir le développement de l'HTP post-pneumectomie sont présentées dans la Figure I.5.4 ci-dessous.

Figure I.5.4. Les différentes pistes thérapeutiques dans l'hypertension pulmonaire post-pneumectomie.



CE-P : cellule endothéliale pulmonaire ; CML-AP : cellule musculaire lisse artérielle pulmonaire ; eNOS : endothelial NO synthase ; COX : cyclooxygénase ; NO : monoxyde d'azote ; EC : enzyme de conversion de l'angiotensine ; PLC : phospholipase C ; GCs : guanylate cyclase soluble ; AC : adénylate cyclase ; AMPc/GMPc : adénosine ou guanosine monophosphate cyclique ; ET1 : endothéline-1 ; ETA/ETB : récepteur à l'endothéline de type A et B ; PDGF : platelet-derived growth factor ; EGF : epidermal growth factor ; FGF : fibroblast growth factor.

II. OBJECTIFS

PLAN

II. 1. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE I DESCRIPTIVE

ETUDE E1 : Hypertension pulmonaire après pneumonectomie : un modèle préclinique chez le rat, associé à un modèle de « *shear stress* » sur cellule endothéliale pulmonaire humaine.

ETUDE E2 : Influence de la mutation BMPR2 sur le niveau d'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite.

ETUDE E3 (PROJET) : Apport de nouvelles techniques dans la caractérisation du remodelage vasculaire pulmonaire et cardiaque après pneumonectomie droite chez le rat.

II. 2. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE II THERAPEUTIQUE

ETUDE T1 : Pré-conditionnement pulmonaire en prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat.

ETUDE T2 : Prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat par un inhibiteur sélectif du *platelet-derived growth factor-Beta receptor*.

ETUDE T3 : Comparaison de trois traitements vasodilatateurs pulmonaires disponibles par voie orale chez l'homme, en prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat : Sildenafil, Macitentan, Selexipag.

II. 3. RECHERCHE CLINIQUE

ETUDE C1 : Modifications précoces de la fonction ventriculaire droite après chirurgie de résection pulmonaire évaluée par le *2D-strain* en échocardiographie : une cohorte prospective (« *RESECHO study* »).

ETUDE C2 (PROJET) : Retentissement des résections pulmonaires majeures sur le couplage ventriculo-artériel du ventricule droit et la tolérance à l'effort à 6 mois : une étude de cohorte prospective bi-centrique (« *ETAP study : Exercise Tolerance After Pulmonary resection surgery* »).

II. Objectifs

Le projet de Thèse comprend une partie expérimentale (avec deux composantes, descriptive et thérapeutique) et une partie de recherche clinique.

Dans la partie expérimentale, L'étude E1 cherchait à évaluer l'hypertension pulmonaire après pneumectomie droite chez le rat. Les objectifs étaient de caractériser l'hypertension pulmonaire, sa chronologie, sa sévérité, la réversibilité des lésions, les lésions histologiques associées, et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Nous voulions caractériser le remodelage cardiaque associé à l'HTP, mais aussi évaluer l'œdème pulmonaire et son retentissement sur l'hématose. Dans cette étude, des expériences *in vitro* ont été menées pour décrire les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués, en reproduisant un « *shear stress* » sur des cellules endothéliales pulmonaires humaines, et en étudiant ses effets sur la prolifération des cellules musculaires lisses. L'étude E2 visait à déterminer si la mutation pour le gène BMPR2 pouvait aggraver le phénotype d'hypertension pulmonaire après pneumectomie chez le rat. L'étude E3, est un projet d'étude, dans lequel nous voulions améliorer le modèle expérimental présenté dans l'étude E1, en y apportant de nouveaux outils ou de nouvelles méthodes d'évaluation, comme la pléthysmographie, le strain en échocardiographie, les boucles pression-volume, le Holter ECG et la tolérance à l'effort sur tapis de course.

En thérapeutique, nous voulions évaluer les effets du pré-conditionnement pulmonaire sur le phénotype cardio-pulmonaire après pneumectomie chez le rat. Nous pensions pouvoir prévenir ou diminuer l'hypertension pulmonaire (étude T1). Ensuite, les résultats de l'étude E1 nous ont amenés à vouloir prévenir l'hypertension pulmonaire après pneumectomie droite chez le rat par un traitement par inhibiteur sélectif du *Platelet-derived growth factor-Béta receptor* (étude T2). L'étude T3, qui a dû être interrompue en cours de route, cherchait à comparer trois traitements vasodilatateurs pulmonaires disponibles par voie orale chez l'homme (Sildénafil, Macitentan, Selexipag), en prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumectomie droite chez le rat.

Dans la partie recherche clinique, l'étude C1 (RESECHO) visait à déterminer l'incidence de la dysfonction ventriculaire droite évaluée par le 2D-*strain* de la paroi libre du VD dans les 72 heures après chirurgie de résection pulmonaire. Les objectifs secondaires étaient de comparer le 2D-*strain* de la paroi libre aux autres marqueurs de fonction systolique VD, de déterminer les facteurs de risque de dysfonction VD après résection pulmonaire, et d'évaluer l'impact d'un *strain* altéré sur le pronostic du patient. L'étude C2 (ETAP) est un projet d'étude, dans lequel nous voulions évaluer le retentissement des résections pulmonaires majeures sur le couplage ventriculo-artériel du ventricule droit et la tolérance à l'effort à 6 mois.

III. MATERIEL ET METHODES

PLAN

III. 1. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE I DESCRIPTIVE.....	71
III. 1. 1. ETUDE E1 : Hypertension pulmonaire après pneumonectomie : un modèle préclinique chez le rat, associé à un modèle de « <i>shear stress</i> » sur cellule endothéliale pulmonaire humaine.....	71
III. 1. 1. 1. Modèle Animal (Etude <i>in vivo</i>).....	71
III. 1. 1. 2. Modèle cellulaire de <i>shear stress</i> (Etude <i>in vitro</i>)	84
III. 1. 2. ETUDE E2 : Influence de la mutation BMPR2	87
III. 1. 3. ETUDE E3 (projet d'étude) : Apport de nouvelles techniques dans la caractérisation du remodelage vasculaire pulmonaire et cardiaque après pneumonectomie droite chez le rat.	89
III. 2. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE II THERAPEUTIQUE	91
III. 2. 1. ETUDE T1 : Pré-conditionnement pulmonaire	91
III. 2. 2. ETUDE T2 : Prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat par un inhibiteur sélectif du récepteur au <i>platelet-derived growth factor</i> -beta.	93
III. 2. 3. ETUDE T3 : Comparaison de trois traitements vasodilatateurs pulmonaires disponibles par voie orale chez l'homme, en prévention de l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie droite chez le rat : Sildénafil, Macitentan, Selexipag.	99
III. 3. RECHERCHE CLINIQUE	
III. 3. 1. ETUDE C1 : Modification précoce de la fonction ventriculaire droite après chirurgie de résection pulmonaire évaluée par le 2D-strain en écho-cardiographie : une cohorte prospective (RESECHO).....	103
III. 3. 2. ETUDE C2 (projet d'étude) : Retentissement des résections pulmonaires majeures sur le couplage ventriculo-artériel du ventricule droit et la tolérance à l'effort à 6 mois : une étude de cohorte prospective bicentrique (ETAP study : <i>Exercise Tolerance After Pulmonary resection surgery</i>).	109

III. 1. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE I DESCRIPTIVE

III. 1. 1. ETUDE E1 : HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE : UN MODELE PRECLINIQUE CHEZ LE RAT, ASSOCIE A UN MODELE DE «*SHEAR STRESS*» SUR CELLULE ENDOTHELIALE PULMONAIRE HUMAINE.

III. 1. 1. 1. MODELE ANIMAL (ETUDE *IN VIVO*)

III. 1. 1. 1. 1. Réglementation en expérimentation animale

III. 1. 1. 1. 1. 1. Autorisations réglementaires

Cette étude expérimentale animale a été réalisée conformément à la réglementation française et européenne. Elle a suivi les directives du Ministère Français de l'Agriculture (décret n° 87-848 ; arrêtés du 19 avril 1988 ; décret n° 2001-464 ; décret n° 2001-486), du Conseil de l'Europe (convention STE N°123) et du Parlement Européen (directive 2010/63/EU). Le Laboratoire INSERM 1046 a le numéro d'agrément suivant: A 34-172-38. Le protocole de recherche concernant le développement du modèle animal et l'étude du pré-conditionnement pulmonaire a reçu l'accord préalable du comité d'éthique en expérimentation animale Languedoc-Roussillon (N°2016012514021222). L'étude des traitements pharmacologiques dans ce modèle animal, mise au point dans un second temps, a également reçu un accord favorable (N°2018091216342585).

III. 1. 1. 1. 1. 2. Respect de la règle des 3R

Nous avons respecté le principe des 3 R. Si une alternative était identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous remplaçons notre stratégie. Nous avons réduit le nombre d'animaux via une approche rationnelle et organisée sur le plan des protocoles (acquisition de données *in vivo* et *in vitro* menées en parallèle sur les mêmes animaux permettant d'apparier les mesures, de diminuer les groupes et d'optimiser les interprétations). Nous avons utilisé de façon optimale les tissus des animaux sacrifiés. Nous avons réalisé un maximum de mesures non invasives sur le même animal. Nous avons raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites. Des traitements antalgiques étaient prévus pour réduire la souffrance animale.



MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Paris, le 06 DEC. 2016

Direction générale
de la recherche
et de l'innovation

Service de la performance,
du financement et de la
contractualisation avec les
organismes de recherche

Département de la culture
scientifique et des relations
avec la société

Cellule Animaux utilisés à des
Fins Scientifiques – AFIS –

Affaire suivie par
Virginie Vallet
Chargée de mission
Responsable de la cellule AFIS

Mél.
virginie.vallet-erdtmann
@recherche.gouv.fr

Plateforme
apafis.demat@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

Objet : Notification d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#3775-2016012514021222 v6,
- ayant pour titre : Effets du pré-conditionnement pulmonaire sur l'hypertension artérielle pulmonaire et la dysfonction cardiaque droite dans un modèle de pneumectomie,
- déposé par l'Établissement Utilisateur : Unité de recherche Inserm U1046, numéro d'agrément A3417238, dont le responsable est Monsieur Jacques CAVAILLE,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par Monsieur Sylvain RICHARD, Madame Saadia EDDAHIBI,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'Établissement Utilisateur, pour une durée de 1 an à compter de l'autorisation.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale N°036 et a reçu un avis favorable.

Ce projet fera l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective. Il vous appartiendra de prendre contact directement avec le Comité d'éthique.

Pour la ministre et par délégation
l'adjointe au chef du service de la performance, du
financement et de la contractualisation avec les
organismes de recherche

Christine COSTE

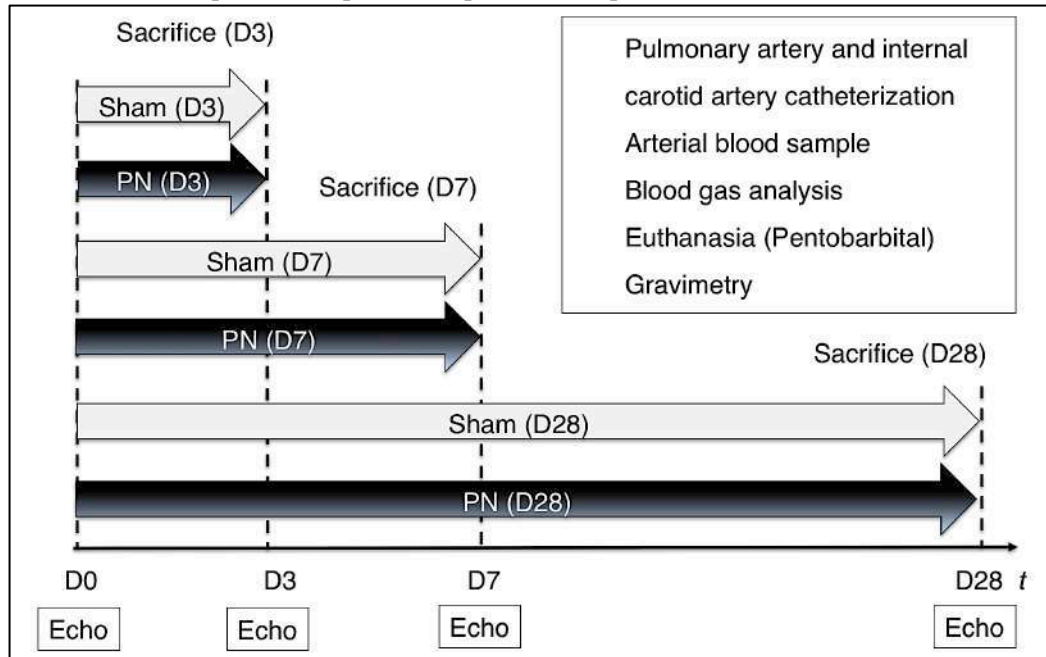
Monsieur Jacques CAVAILLE
Unité de recherche Inserm U1046

III. 1. 1. 1. 2. Groupes étudiés

III. 1. 1. 1. 2. 1. Evaluation au 3^{ème}, 7^{ème} et 28^{ème} jour postopératoire

Toutes nos expériences ont été réalisées sur des rats mâles *Sprague-Dawley* à leur 10^{ème} semaine de vie (poids d'environ 400 g). Pour chaque temps d'évaluation, les rats étaient randomisés et aléatoirement répartis entre les groupes contrôle (sham) ou pneumectomie (PN) (Figure III.1.1.1.2.1).

Figure III.1.1.1.2.1. Groupes de rats prévus, et protocole expérimental.



III. 1. 1. 1. 2. 2. Evaluation à 2 mois

Une évaluation supplémentaire 2 mois après la chirurgie a été réalisée afin de vérifier que les altérations cardio-pulmonaires que nous avons observées à D28 n'étaient ni temporaires ni réversibles. Ce nouveau « *time point* » a nécessité deux groupes de 10 rats supplémentaires, sham_{D56} et PN_{D56}.

D'ailleurs, ces données sur l'effet de la pneumonectomie « à long terme » ont été demandées par la revue *Anesthesiology* au cours du processus de *reviewing*. Il était alors aisé de leur répondre, puisque les résultats étaient déjà en notre possession et disponibles pour les *reviewers*.

III. 1. 1. 1. 3. Modèle expérimental de pneumonectomie droite chez le rat

III. 1. 1. 1. 3. 1. Anesthésie

Les procédures chirurgicales étaient réalisées sous anesthésie générale. L'anesthésie était réalisée par injection intra-péritonéale de Pentobarbital à la dose de 75 mg/kg. Dans les études suivantes, l'anesthésie

inhalatoire par gaz halogénés a été ensuite préférée aux barbituriques. Celle-ci était réalisée par Isoflurane, d'abord en cuve à 4-5% puis sur le circuit du ventilateur entre 2 et 3%. Les raisons de ce changement étaient que la stabilité hémodynamique était meilleure sous Isoflurane (meilleur rythme cardiaque), et les durées de réveil étaient plus courtes (de l'ordre de 20 minutes vs une à deux heures pour le Pentobarbital), nous permettant de réaliser un plus grand nombre de chirurgies dans la même journée.

Après intubation orotrachéale au cathlon 14G, les animaux étaient ventilés sur un respirateur spécifique au petit animal (PhysioSuite® MouseVent® - Kent Scientific, Torrington, USA) selon un protocole de ventilation contrôlée protectrice (volume courant de 7 ml/kg, FiO₂ 21%, fréquence respiratoire 80/min, PEP 4 cmH₂O, ratio I/E = 1/2). En ventilation uni-pulmonaire, le volume courant était diminué à 6 ml/kg.

Pendant toute la durée de la procédure, la température corporelle était contrôlée par tapis chauffant et monitorée en continu par une sonde rectale (PhysioSuite® RightTemp® - Kent Scientific, Torrington, USA), ainsi que la fréquence et le rythme cardiaque sur un moniteur externe.

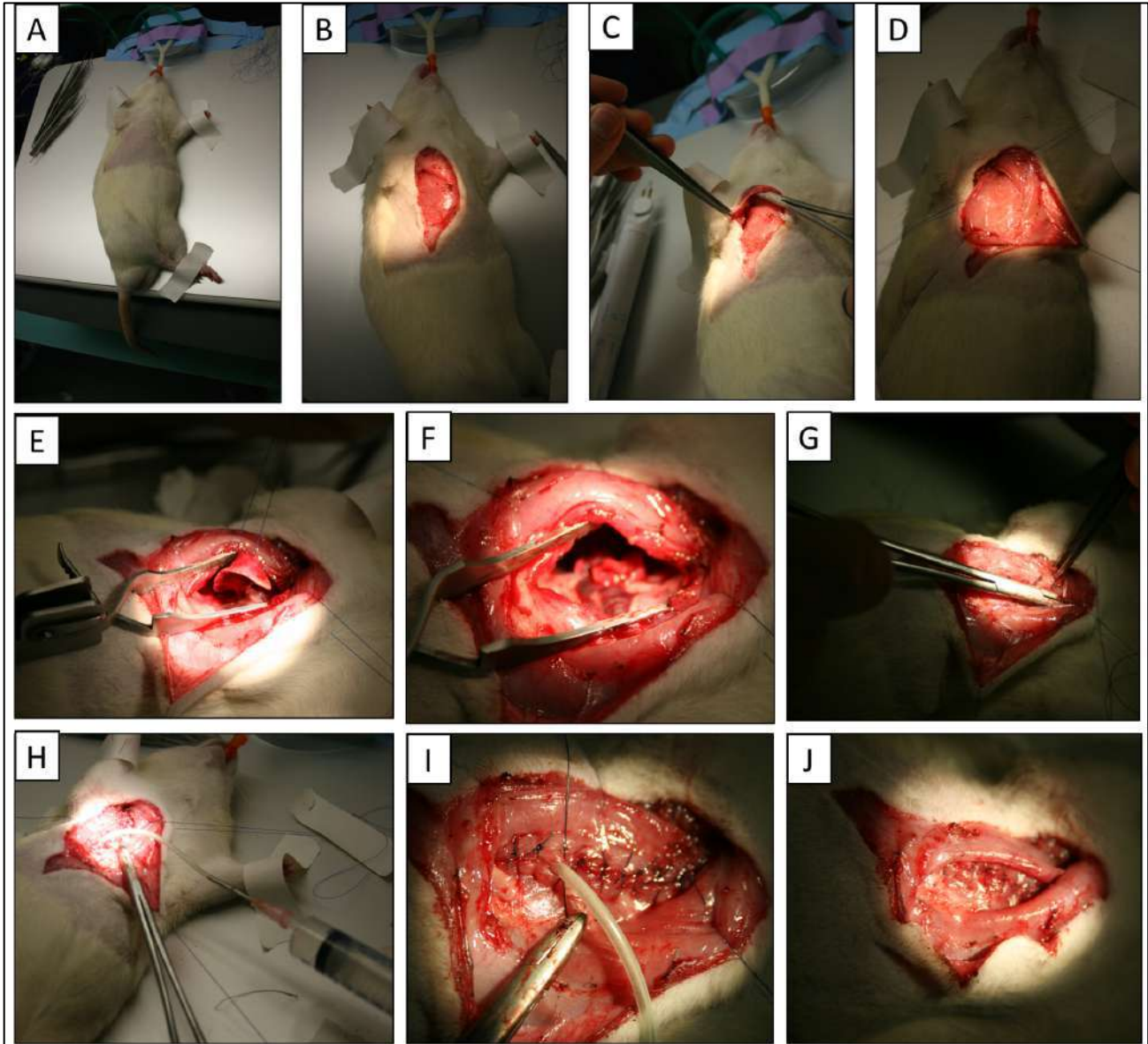
En fin d'intervention chirurgicale, les animaux étaient tous remplis par 3 ml de sérum salé NaCl 0,9% (B. Braun®) par voie intra-péritonéale (\approx 7 ml/kg). Le poumon droit représentant environ 7% de la volémie du rat, nous voulions éviter l'hypovolémie postopératoire. Une fois que les animaux avaient récupéré une ventilation spontanée, le mode ventilatoire était modifié pour une ventilation assistée (aide inspiratoire 12 cmH₂O, Trigger en pression -0.3 cmH₂O, PEP 4 cmH₂O). Avant extubation, les animaux étaient déconnectés du ventilateur quelques minutes pour évaluer leur tolérance à la ventilation spontanée. Si la tolérance était jugée bonne par l'opérateur (bonne mécanique respiratoire, pas de décélération cardiaque au moniteur, pas d'élargissement des QRS), les animaux étaient extubés avant d'être débranchés du monitoring et placés en couveuse à 34°C.

L'analgésie post-opératoire était réalisée à l'aide d'injections sous-cutanées de Buprénorphine à la dose de 0.04 mg/kg, toutes les 12 heures pendant les 24 premières heures. La première injection débutait avant extubation. Par la suite, la première injection était réalisée avant l'intubation au cathlon et précédait l'anesthésie générale inhalatoire pour la potentialiser. Le même protocole d'analgésie était poursuivi si besoin jusqu'à la 48^{ème} heure post-opératoire, selon les critères de bien-être animal.

III. 1. 1. 1. 3. 2. Chirurgie

Thoracotomie

La procédure chirurgicale était standardisée, réalisée toujours par le même opérateur. La zone opérée était rasée puis désinfectée à la Chlorhexidine 0.2%. Une incision verticale du plan cutané était réalisée sur une longueur de 2 cm au niveau parasternal droit ([Figure III.1.1.1.3.2](#)). Le plan musculaire était disséqué jusqu'au plan costo-pleural. Une thoracotomie était réalisée sur maximum quatre arcs costaux (2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} arcs costaux), en prenant soin de ne pas léser le poumon homolatéral exposé à la vue.

Figure III.1.1.1.3.2. Protocole chirurgical de pneumectomie droite chez le rat (P. Bideaux, P. Sentenac).

A : Installation du rat en décubitus latéral gauche ; B : Ouverture du plan cutané ; C : Dissection du plan musculaire ; D : Exposition du grill costal ; E : Visualisation du poumon droit et ligature du hile pulmonaire droit au fil Vicryl® ; F : Visualisation de la cavité pleurale droite vide ; G : Fermeture de la thoracotomie par le plan costal et musculaire ; H : Mise en place d'un drain pleural à droite ; I : Retrait du drain pleural droit avec fermeture simultanée du dernier point sur le grill costal ; J : Grill costal fermé.

Pneumectomie droite

La pneumectomie droite commençait par une ligature du pédicule pulmonaire droit au fil tressé Vicryl® 4.0, avant résection du poumon droit en bloc.

Dans les groupes sham, le poumon droit était laissé en place, aucune ligature ni résection n'était réalisée, mais une période d'observation de même durée était observée de façon à avoir la même durée opératoire dans tous les groupes.

Fermeture et hémostase

L'hémostase était réalisée par coagulation au bistouri électrique. La cavité pleurale était lavée au sérum salé 0.9%. Après la fermeture étanche du plan costal, le pneumothorax était évacué à l'aide d'une seringue de 5 ml branchée à un cathlon. Après une dernière désinfection à la Chlorhexidine 0.2%, le plan musculaire puis cutané étaient fermés par un fil tressé à résorption lente Vicryl® 4.0.

III. 1. 1. 1. 4. Etude de l'hypertension pulmonaire et du remodelage vasculaire pulmonaire

III. 1. 1. 1. 4. 1. Mesure invasive des pressions par cathétérisme cardiaque

A la fin de leur période respective de suivi (D3, D7 ou D28), les animaux étaient anesthésiés par Pentobarbital à la dose de 75 mg/kg, puis intubés au cathlon 14G avant d'être placés sous ventilation mécanique (PhysioSuite® MouseVent® - Kent Scientific, Torrington, USA), selon un protocole de ventilation protectrice (VT 6 ml/kg, FiO₂ 21%, FR 80/min, PEP 4 cmH₂O, ratio I/E = 1/2). Dans les études suivantes, les animaux étaient anesthésiés par Isoflurane en cuve d'inhalation avec un entretien de l'anesthésie par Isoflurane 2%.

Figure III.1.1.1.4.1. Procédure de cathétérisme artériel pulmonaire par la veine jugulaire interne droite.

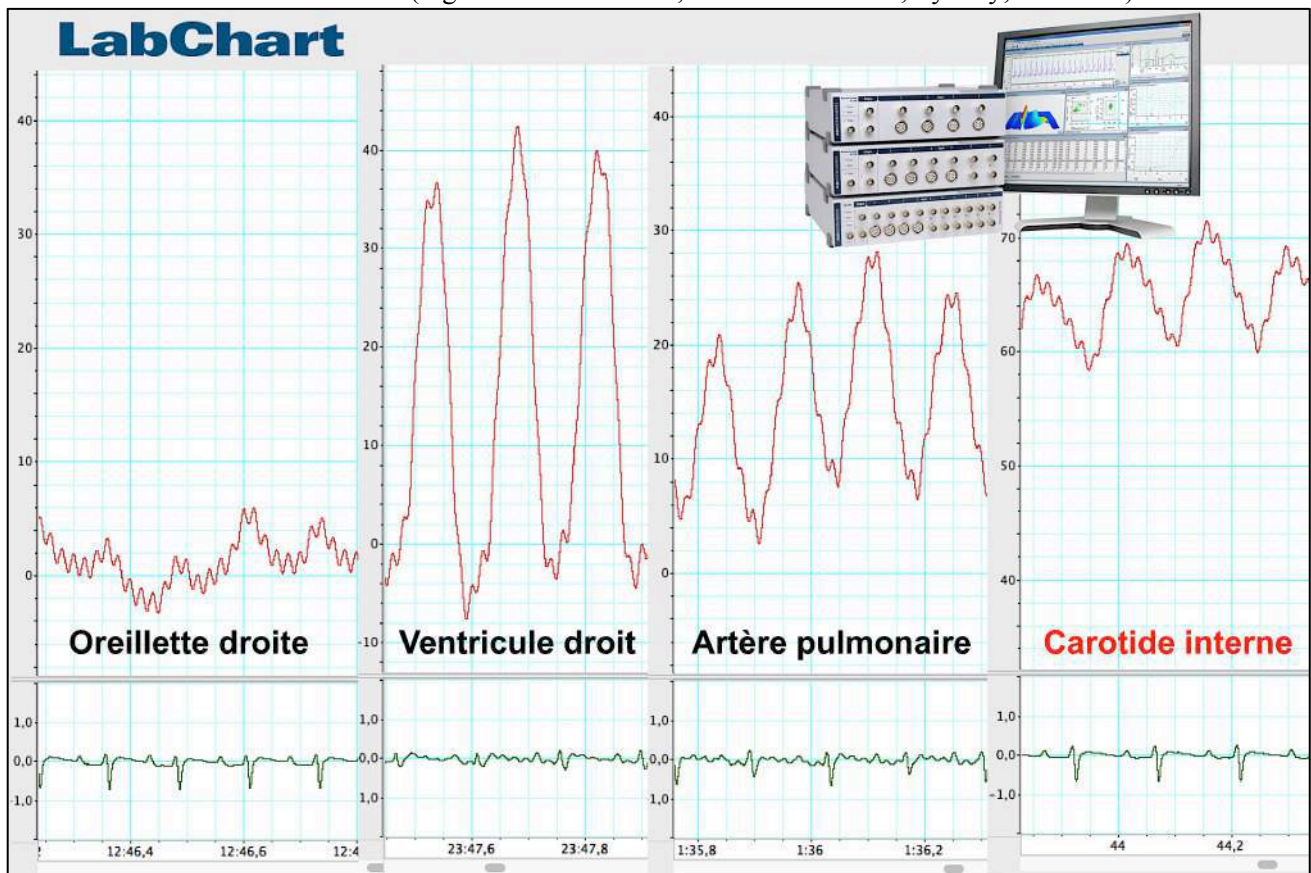


La mesure invasive des pressions était réalisée dans des conditions strictes d'asepsie. Après dissection de la loge cervicale droite, un cathéter de polyurethane (Argyle™ *polyurethane umbilical vessel catheter, single lumen, 2.5 Fr/Ch 0.8 mm x 12"*, Covidien®, Dublin, Irlande) était introduit dans la veine jugulaire interne droite, jusque dans le ventricule droit et l'artère pulmonaire (Figure III.1.1.1.4.1). Puis, un autre cathéter de vinyle était introduit dans l'artère carotide commune droite pour mesurer la PA systémique.

Les cathéters étaient rincés au sérum salé 0,9% hépariné (50 UI d'héparine par ml de sérum physiologique). L'extrémité du cathéter était reliée à une cellule et un moniteur de pression (AD

Instruments®, Sydney, Australia), lui-même relié à un ordinateur portable. La cellule était calibrée avec un point à 0 mmHg et un point à 100 mmHg, la calibration était la même pour toutes les mesures. Les acquisitions et analyses de pression étaient réalisées avec le logiciel LabChart™ 7 (AD Instruments®, Sydney, Australia). Les paramètres suivants étaient alors mesurés (les pressions sont toutes exprimées en mmHg) : fréquence cardiaque (bpm), pression de l'oreillette droite (POD ou RAP, *right atrial pressure*), pression systolique du VD (PVDs ou RVSP, *right ventricle systolic pressure*), PAP systolique, diastolique et moyenne (PAPs, PAPd, PAPm, *pulmonary arterial pressure*), pression artérielle systolique, diastolique et moyenne (PAS, PAD, PAM ou *arterial blood pressure*) (Figure III.1.1.4.2).

Figure III.1.1.4.2. Exemple de courbes de pression invasive obtenues par cathétérisme jugulaire interne droit et carotidien droit chez le rat (logiciel LabChart™ 7, AD instruments®, Sydney, Australia).



III. 1. 1. 4. 2. Muscularisation des artères pulmonaires distales

Prélèvement de tissus

Après décès de l'animal, une thoracotomie large était réalisée pour procéder au prélèvement des organes d'intérêt, dans des conditions strictes d'asepsie. Le bloc cœur-poumons était détaché de la cavité thoracique avant d'être placé dans du sérum physiologique.

Dans chaque groupe, seul le poumon gauche était conservé pour que les prélèvements soient comparables. Le lobe supérieur gauche était fixé dans son état distendu grâce à une injection intra-trachéale de Formol avant d'être plongé dans le Formol. Le lobe inférieur gauche était divisé en deux parties. Une partie était pesée à l'état « humide » puis placée à 37°C pendant 72 heures avant d'être pesée à l'état « sec » pour mesurer l'œdème pulmonaire par le rapport « *Wet/Dry* ».

$$\llcorner \text{« } Wet/Dry \text{ » ratio} = (\text{Poids du poumon humide} / \text{Poids du poumon sec}) \llcorner$$

L'autre partie du poumon était congelée dans l'azote liquide selon la technique du « *Quick-Freeze* », puis conservée à -80°C. Le prélèvement du cœur est décrit dans la section « Remodelage cardiaque ». Le rein gauche (organe témoin) était prélevé et congelé selon la même méthode.

Analyse histologique

Après inclusion en blocs de paraffine des poumons fixés au formol, des sections pulmonaires de 5 µm d'épaisseur ont été montées sur des lames *Superfrost*. Une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) a permis d'évaluer au microscope optique le degré de muscularisation de 40 à 60 artères pulmonaires intra-acinaires (diamètre du vaisseau < 100 µm) pour chaque rat.

Chaque vaisseau était catégorisé en trois groupes : complètement muscularisé (M), partiellement muscularisé (PM), non muscularisé (NM).

Enfin, l'épaisseur relative de la paroi (*RWT*, *relative wall thickness*) des artères pulmonaires muscularisées (M) était estimée selon la formule suivante :

$$\llcorner \text{« } Relative\ Wall\ Thickness \text{ »} = (\text{diamètre externe} - \text{diamètre interne}) / \text{diamètre externe} \llcorner$$

III. 1. 1. 4. 3. Analyse immuno-histochimiques sur coupes de poumon

La prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, et l'infiltration de macrophages au sein du poumon ont été évaluées respectivement grâce à un marquage PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) et CD68. L'angiogenèse pulmonaire a été étudiée par un marquage CD31.

Les coupes pulmonaires ont été déparaffinées dans du HistoClear® (*Agar scientific*®, Stansted, UK) puis passées dans une série de bains à pourcentage d'éthanol décroissant et réhydratées dans du PBS (*Phosphate-buffered saline*). Les sites antigéniques ont été démasqués en plaçant les coupes dans une solution citrate (pH6) à 95°C pendant 30 min. Après un rinçage dans du PBS, les coupes ont été incubées dans une solution de saturation (10% sérum de l'hôte de l'anticorps secondaire +/- 5% BSA dilué dans du PBS) pendant 30 minutes afin de bloquer les sites aspécifiques. Les coupes ont ensuite été directement mises en contact avec l'anticorps primaire : anticorps monoclonal de souris anti-PCNA (1/200^{ème}, PC-10,

Dako®), anticorps monoclonal de souris anti- CD68 (1/200^{ème}, MCA341R, AbDserotec®, Hercules, USA) anticorps monoclonal de souris anti- CD31 (1/200^{ème}, BD Biosciences®, San Jose, USA) pendant toute la nuit à 4°C. L'anticorps primaire a ensuite été rincé plusieurs fois puis deux types de révélation ont été utilisés.

Marquage PCNA

Les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris biotinylé (30 minutes à température ambiante), suivi d'une phase d'amplification reconnaissant les biotines avec le kit *Vectastain ABC-AP* (AK-5002, Vector Laboratories®, San Francisco, USA). La révélation a ensuite été obtenue à l'aide du kit *Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate* (SK-5100, Vector Laboratories®, San Francisco, USA). Enfin, une contre-coloration à l'hématoxyline a été réalisée afin de visualiser les noyaux.

Marquage CD31 et CD68

Les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorophore FITC et un fluorophore Alexa-fluor 594 (30 minutes à température ambiante) (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Les noyaux ont été marqués au diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0.25 mg/ml dilué dans du PBS.

Une fois les marquages réalisés, les lames étaient analysées à l'aide d'un microscope à lumière blanche ou à épifluorescence et du logiciel NiS Element (Nikon® 80i).

III. 1. 1. 1. 5. Etude du remodelage cardiaque et de la fonction cardiaque

III. 1. 1. 1. 5. 1. Mesure de l'indice d'hypertrophie du ventricule droit par gravimétrie (indice de Fulton)

Le cœur entier était pesé, puis les oreillettes étaient détachées, VD puis VG étaient pesés séparément pour le calcul de l'indice d'hypertrophie du VD (RVHI, *right ventricle hypertrophy index*, ou indice de Fulton [110]).

$$\boxed{\text{Indice de Fulton} = \left\{ \frac{\text{poids du VD}}{\text{poids VG} + \text{septum}} \right\}}$$

Après la pesée, les deux ventricules étaient séparés en deux morceaux, le premier était fixé dans le Formol, et le second (à la partie la plus apicale du cœur) était placé dans un tube Eppendorf® stérile de 2 ml avant d'être congelé dans l'azote liquide (technique du « *Quick-Freeze* ») et conservé au congélateur à -80°C.

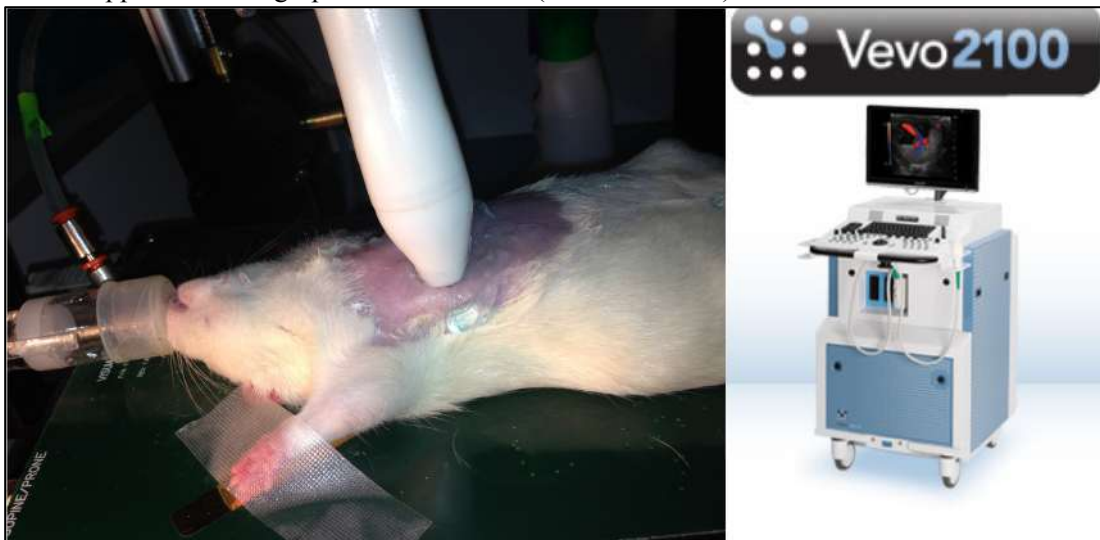
III. 1. 1. 1. 5. 2. Imagerie in vivo : échographie cardiaque

La fonction cardiaque était étudiée en échographie, par un examinateur indépendant, en aveugle de la chirurgie, le matin de la chirurgie (D0), et au 3^{ème}, 7^{ème}, et 28^{ème} jours postopératoires (D3, D7 et D28 respectivement). L'analyse des images était ensuite effectuée en « post-acquisition » par un troisième intervenant, indépendant des deux premiers.

Chaque examen échographique était pratiqué en ventilation spontanée, sous anesthésie générale inhalatoire par Isoflurane 2%, chez des rats non intubés, en ventilation spontanée. Une fois l'animal anesthésié, le thorax était rasé et un gel d'échographie était appliqué pour améliorer l'échogénicité (Figure III.1.1.1.5.2). Tous les examens ont été réalisés avec l'appareil Vevo 2100™ (VisualSonics®, Fujifilm Sonosite®, Tokyo, Japan), sous monitoring continu de la fréquence et du rythme cardiaque, de la fréquence respiratoire, ainsi que de la température corporelle. L'examen utilisait quatre « fenêtres » échographiques principales (Figure III.1.1.1.5.2.1) : para-sternale grand axe (LAX), para-sternale petit axe (SAX), para-sternale petit axe centrée sur l'aorte (SAXaorte), et 4 cavités (4C).

Par la suite, le laboratoire a fait l'acquisition du Vevo 3100™ (VisualSonics, Fujifilm Sonosite®, Tokyo, Japan).

Figure III.1.1.1.5.2. Protocole d'échographie cardiaque sous anesthésie inhalatoire par Isoflurane chez le rat, utilisant l'appareil d'échographie Vevo 2100™ (VisualSonics®).



Les paramètres mesurés en échocardiographie étaient les suivants :

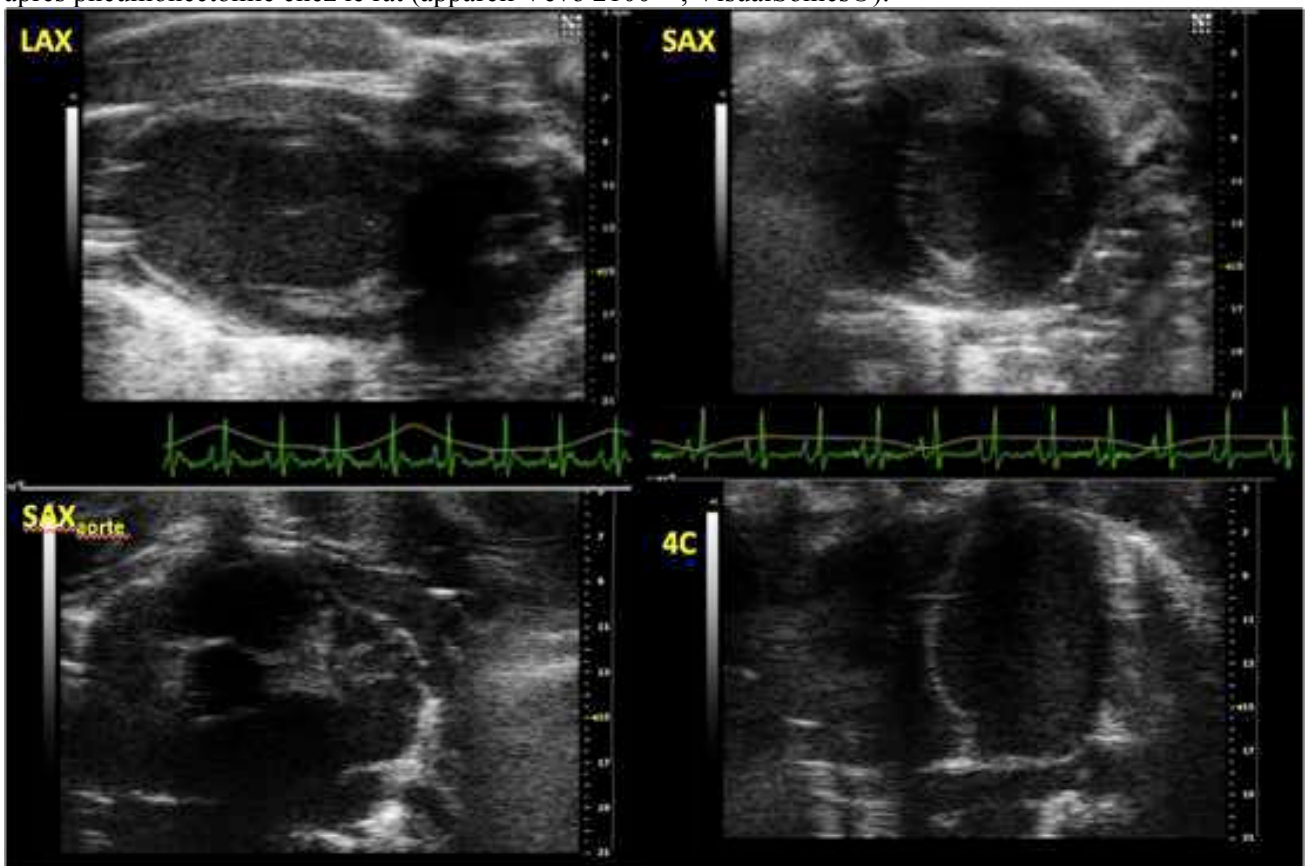
Cœur gauche

- Dimensions : diamètre de la chambre de chasse VG (LVOT, *LV outflow tract diameter*, mm), diamètre télé-diastolique VG (LVEDD, *LV end-diastolic diameter*, mm), surface télé-diastolique VG

(LVEDA, *LV end-diastolic area*, mm²), épaisseur de la paroi antérieure (LVAW, *LV anterior wall*, mm) et postérieure (LVPW, *LV posterior wall*, mm) du VG.

- Fonction systolique VG : fraction d'éjection (LVEF, *LV ejection fraction*, %), fraction de raccourcissement (LVSF, *LV shortening fraction*, %), intégrale temps-vitesse sous aortique (VTI, mm), temps d'accélération aortique (AAT, *aortic acceleration time*, ms), temps d'éjection aortique (AET, *aortic ejection time*, ms).
- Profil mitral : vitesse de l'onde E mitrale (Em, mm/s), durée de l'onde Em (ms), temps de décélération de l'onde Em (ms), vitesse de l'onde A mitrale (mm/s), durée de Am (ms).

Figure III.1.1.5.2.1. Fenêtres échocardiographiques utilisées pour l'évaluation de la fonction cardiaque après pneumonectomie chez le rat (appareil Vevo 2100™, VisualSonics®).



LAX-view (long-axis) : LV outflow tract, LV anterior wall thickness, LV ejection fraction.

SAX-view (short-axis) : RV/LV end-diastolic diameter, RV/LV end-diastolic area, RV lateral wall thickness, RV fractional area change.

SAXaorta view (short-axis aortic valve -centered): RV outflow tract, PA diameter, PA VTI, PV regurgitation, TV Diameter, TV regurgitation peak velocity

Four-chamber view (4C) : LV ejection fraction, aortic VTI, cardiac output, mitral inflow pattern, tricuspid inflow pattern, TAPSE.

Cœur droit

- Dimensions : diamètre de la chambre de chasse du VD (RVOT, *right ventricle outflow tract diameter*, mm), diamètre télé-diastolique VD (RVEDD, *RV end-diastolic diameter*, mm), surface télé-diastolique VD (RVEDA, *RV end-diastolic area*, mm²), surface de l'oreillette droite (RAA, *right atrium area*, mm²), épaisseur de la paroi latérale du VD (RVLW, *RV lateral wall thickness*, mm), diamètre de l'anneau tricuspide (TVD, *tricuspid valve diameter*, mm), rapport VD/VG en surface (%).
- Fonction systolique VD : fraction de raccourcissement de surface (RV-FAC, *RV fractional area change*, %), mesure du TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*, mm).
- Valve tricuspide : vitesse maximale de la fuite tricuspide (TVR v_{max}, *tricuspid valve regurgitation maximal velocity*, mm/s), vitesses de l'onde E tricuspide (Et, mm/s), A tricuspide (At, mm/s), et calcul du rapport Et/At.
- Valve pulmonaire : VTI sous-pulmonaire (cm) et sa variabilité respiratoire (Δ VTI), temps d'éjection pulmonaire (PET, *pulmonary ejection time*, ms), temps d'accélération systolique pulmonaire (PAT, *pulmonary acceleration time*, ms), vitesse maximale de la fuite pulmonaire (PVR v_{max}, *pulmonary valve regurgitation maximal velocity*, m/s).

III. 1. 1. 1. 5. 3. Evaluation de la fibrose cardiaque

Une coloration au trichrome de Masson a été réalisée sur les coupes de cœur afin d'évaluer l'accumulation de matrice extracellulaire. Cette technique comprenait une coloration du collagène au bleu d'aniline, une coloration des noyaux à l'hématoxyline et une coloration du cytoplasme cellulaire à la fuschine ponceau. Les lames étaient ensuite analysées au microscope à lumière blanche ou à épifluorescence, avec l'aide du logiciel NiS Element (Nikon® 80i, Tokyo, Japan). La quantification de la fibrose utilisait le logiciel NDPview™ (Nanozoomer Digital Pathology™, Hamamatsu®, Japan).

III. 1. 1. 1. 6. Evaluation de l'œdème pulmonaire après pneumonectomie**III. 1. 1. 1. 6. 1. Mesure de l'œdème pulmonaire par le rapport « Wet / Dry »**

Le lobe inférieur gauche était divisé en deux parties. Une partie était pesée à l'état « humide » puis placée à 37°C pendant 72 heures, avant d'être pesée à l'état « sec » pour mesurer l'œdème pulmonaire par le rapport « Wet/Dry ».

$$\llcorner \text{Wet / Dry} \llcorner \text{ ratio} = \{ \text{poids du poumon humide} / \text{poids du poumon sec} \}$$

III. 1. 1. 1. 6. 2. Retentissement de l'œdème pulmonaire et de la pneumonectomie sur l'hématose

Prélèvement sanguin

A la fin de la procédure de cathétérisme, un échantillon de sang était prélevé directement dans le cathéter carotidien à l'aide d'une seringue de 5 ml (ou par ponction dans le ventricule gauche en cas d'impossibilité de prélever par le cathéter artériel).

Gaz du sang artériel

Le sang fraîchement prélevé permettait de remplir un capillaire à gaz du sang (0.5 ml) acheminé aussitôt dans le service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire de l'Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHU Montpellier (Professeur Maurice Hayot) pour analyse sur l'appareil COBAS b22™ (Roche®, *Rotkreuz, Switzerland*). Les paramètres mesurés étaient les suivants : pH, PaO₂ et PaCO₂ (mmHg), SaO₂ et hématicrite (%), Na, K, HCO₃⁻ et excès de base (mmol/L), Hb (g/dl).

III. 1. 1. 1. 7. Etude des mécanismes moléculaires

III. 1. 1. 1. 7. 1. Dosage des marqueurs plasmatiques

Préparation du plasma

Le reste de l'échantillon sanguin était placé dans un tube EDTA (7 ml) dans la glace. Le sang prélevé était centrifugé à 5000 G à 4°C pendant 20 minutes. Le plasma était ensuite recueilli à la pipette avant d'être congelé à -80°C.

Dosage des principaux marqueurs d'intérêt

Le plasma congelé était conservé en vue du dosage des différents marqueurs plasmatiques d'intérêt : BNP, Endotheline-1, facteurs angiogéniques (VEGF, angiopoietine), facteurs de croissance (PDGF, EGF, FGF), cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TGFβ).

III. 1. 1. 2. MODELE CELLULAIRE DE *SHEAR STRESS* (ETUDE *IN VITRO*)

III. 1. 1. 2. 1. Isolement des cellules humaines

Des cellules endothéliales pulmonaires (P-ECs, *pulmonary endothelial cells*) et des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (PA-SMCs, *pulmonary artery smooth muscle cells*) humaines ont été isolées à partir de tissu pulmonaire de dix patients atteints de cancer du poumon, à distance de la tumeur, comme décrit précédemment [2,45]. Les patients devaient être indemnes d'hypertension pulmonaire et de bronchite chronique obstructive (BPCO). Le consentement éclairé écrit était obtenu de tous les patients avant l'expérimentation. Le protocole a été préalablement approuvé par le comité d'éthique local de l'Hôpital Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France) (ID RCB 2008-A00485-50).

III. 1. 1. 2. 2. Mise en culture dans le système FlexCell

Les P-ECs étaient mises en culture à la concentration de 10^5 cellules par puits, et exposées pendant 24 heures, dans un système FX-5000 Tension Plus™ (FlexCell®, Burlington, VT, USA), soit à un étirement cyclique de grande amplitude, allongement de 18% (« *stretch* » pathologique), soit de faible amplitude, allongement de 5% (« *stretch* » physiologique), à la fréquence de 1 Hz. Le surnageant des P-ECs était collecté.

Les cellules musculaires lisses isolées étaient cultivées dans quatre milieux de culture différents, à la concentration de 10^5 cellules par puits. Les PA-SMCs étaientensemencées avec le surnageant des P-ECs « *non stretchées* », avec le surnageant des P-ECs « *stretchées* », et dans deux milieux témoins, 0% et 5% de FCS (*Fetal calf serum*, sérum de veau fœtal), pour une capacité de prolifération minimale et maximale respectivement. Dans chacun des milieux de culture, les PA-SMCs étaient exposées ou non à un étirement cyclique pendant 24 heures, soit physiologique (5% d'étirement), soit pathologique (18% d'étirement) (Figure III.1.1.2.2).

Ces deux niveaux d'étirement cyclique ont été préalablement validés par Birukov *et al.* [111]. De plus, la relation entre l'étirement cyclique et le « *shear stress* » a déjà été décrite [112].

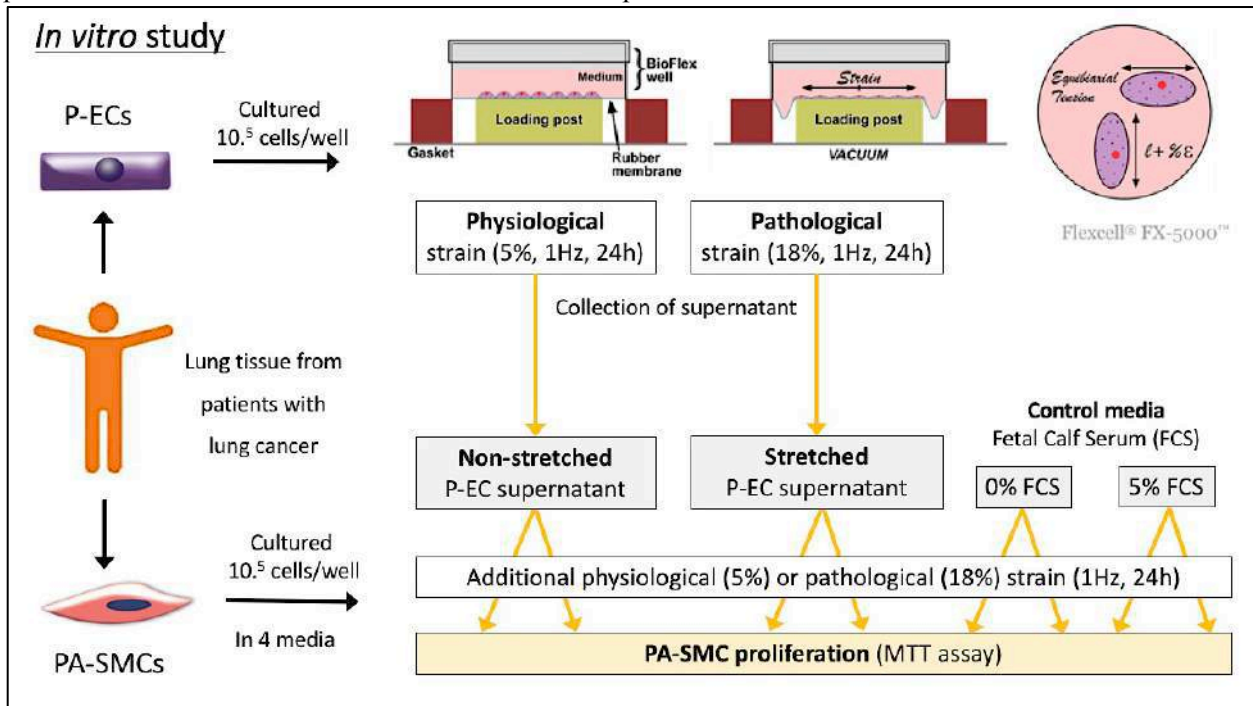
À la fin de la période d'exposition, la prolifération cellulaire des PA-SMCs était mesurée à l'aide d'un test au sel de tétrazolium (MTT assay) Les expériences ont été réalisées sur 10 échantillons, et chaque échantillon a été analysé en « *triplicate* ».

III. 1. 1. 2. 3. Protocole de RT-PCR quantitative

L'ARN total des P-EC exposées ou non à un étirement cyclique pathologique était isolé à l'aide du réactif Trizol. Une RT-PCR quantitative (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) était

ensuite réalisée à l'aide de Light Cycler®480 (Roche Lifescience®, Penzberg, Allemagne) dans une plaque 96 puits, comme décrit précédemment [45]. Les amorces qRT d'Applied Biosystems™ (Lifes Technology®, France) ont été utilisées, et une quantification de l'ARN ribosomal 18S était utilisée comme contrôle interne. La quantification relative a été réalisée avec la méthode comparative 2- $\Delta\Delta C_t$ par normalisation avec l'ARN ribosomal 18s (unités arbitraires, moyenne \pm ET).

Figure III.1.1.2.2. Représentation schématique des expériences menées sur cellules endothéliales pulmonaires et cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires humaines.



FCS : fetal calf serum ; PA-SMC : cellule musculaire lisse de l'artère pulmonaire ; P-EC : cellule endothéliale pulmonaire ; MTT : test au sel de tétrazolium

III. 1. 1. 3. ANALYSE STATISTIQUE

III. 1. 1. 3. 1. Calcul du nombre d'animaux nécessaires

Le critère de jugement principal était la PAP moyenne. Six rats par groupe étaient nécessaires pour mettre en évidence une différence de PAP moyenne de 10 mmHg entre les groupes sham et PN à D28 (valeurs attendues de 25 et 35 mmHg, respectivement, écart type 5 mmHg), avec une puissance statistique de 90% et un risque alpha bilatéral de 0.05. Le nombre de rats a été augmenté à 10 rats par groupe par temps d'évaluation pour minimiser le risque d'erreur de type II.

III. 1. 1. 3. 2. Description du plan d'analyse statistique

L'analyse statistique était faite avec Prism 6™ puis Prism 8™ (logiciel GraphPad®, La Jolla, CA, USA). Les valeurs aberrantes ont été analysées et aucune exclusion de valeur n'a été nécessaire. Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type (avec médiane et «*min to max*» dans les *box-plots*).

Avant tout, nous avons effectué une description globale de chacune des variables quantitatives et qualitatives, et la normalité de la distribution était évaluée à l'aide des tests de Shapiro – Wilk.

Les données qui suivaient une distribution gaussienne ont été analysées par des tests paramétriques : des analyses de variance (ANOVA) pour les comparaisons multiples ; et des t-tests pour comparer deux groupes. L'hétéroscédasticité (non homogénéité des variances des erreurs du modèle) était évaluée à l'aide du test de Spearman. Les tests ANOVA étaient bidirectionnels, les deux facteurs étaient le groupe et le temps de l'évaluation. Des comparaisons *a posteriori* ont été effectuées avec la correction de Sidak pour des comparaisons multiples. Les valeurs appariées ont été analysées par des ANOVA appariées ou des t-tests appariés.

Les données qui ne suivaient pas une distribution gaussienne ont été analysées par des tests non paramétriques : des tests Mann-Whitney quand les valeurs étaient non appariées ; des tests Wilcoxon quand les valeurs étaient appariées. Les données qualitatives ont été comparées à l'aide d'un test du χ^2 ou d'un test exact de Fisher. Les données de survie ont été comparées à l'aide d'un test du Log-Rank.

Toutes les valeurs $P < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

III. 1. 2. ETUDE E2 : INFLUENCE DE LA MUTATION BMPR2 SUR LE NIVEAU D'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE DROITE.

III. 1. 2. 1. Rappel du rationnel de l'étude

La mutation BMPR2 est un facteur prédisposant dans l'HTAP idiopathique et d'autres maladies vasculaires [113]. C'est la première cause d'HTAP héritable. L'HTAP liée aux mutations BMPR2 est une maladie autosomique dominante à pénétrance incomplète.

Dans plusieurs types de modèles expérimentaux chez la souris, il est démontré que les souris mutées pour le BMPR2 développaient une HTP plus sévère que les phénotypes « sauvages » en réponse à un stress comme l'hypoxie chronique [24]. Seulement, les souris sont d'assez mauvais modèles pour l'étude de l'HTAP car réputées « résistantes » [24,114]. Chez le rat, les réponses pro-prolifératives et hémodynamiques sont beaucoup plus robustes que chez la souris, dans la plupart des modèles de PH induits expérimentalement [115]. Enfin, la chirurgie de pneumonectomie est techniquement plus difficile à réaliser chez la souris que chez le rat, raison pour laquelle nous voulions tester les effets de la pneumonectomie chez des rats mutés pour le BMPR2.

III. 1. 2. 2. Obtention d'une souche de rats mutés BMPR2

Les rats mutés pour le BMPR2 ont été obtenus auprès de Frédéric Perros, du centre de référence de l'hypertension pulmonaire (INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Université Paris Sud, Hôpital Marie-Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France). Il faut insister sur le fait que l'équipe de Frédéric Perros est la première au monde à avoir développé une lignée de rats mutés pour le BMPR2 [114].

Les rats avaient une délétion mono-allélique de 71 paires de bases (pb) dans l'exon 1 (nommés rats $\Delta 71$) Dans leur publication originale, Hautefort *et al.* ont montré une diminution de l'expression de BMPR2 et des niveaux de SMAD1/5/9 phosphorylés qui sont les voies de signalisation intracellulaire du BMPR2 [114]. Les rats $\Delta 71$ développaient une HTAP spontanée, dépendante de l'âge, avec une faible pénétrance (16% -27%), similaire à ce qui est observé chez l'homme. Les rats $\Delta 71$ étaient plus sensibles à l'HTP induite par l'hypoxie que les rats « sauvages ». Ils présentaient un remodelage vasculaire pulmonaire progressif de type hyper-prolifératif. Enfin, l'étude des cardiomyocytes a montré des altérations de la morphologie et de la contractilité cellulaire spécifiques au ventricule droit [114].

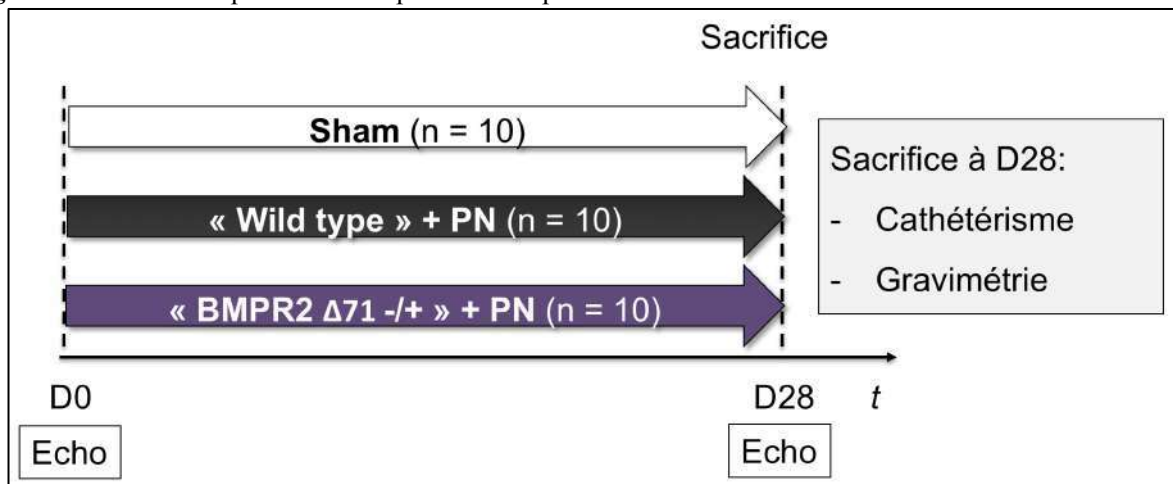
III. 1. 2. 3. Hypothèse de travail

A partir de ces données, notre hypothèse de travail était que les porteurs de la mutation pour le *BMPR2* ($\Delta 71$) présenteraient une hypertension pulmonaire et une dysfonction VD plus sévère après pneumonectomie que les rats de phénotype « sauvage ».

III. 1. 2. 4. Groupes étudiés et protocole expérimental

Une pneumonectomie droite était réalisée selon le protocole décrit précédemment, chez des rats mâles de souche « sauvage » et chez les rats « $\Delta 71$ » porteurs de la mutation *BMPR2* (n = 10 rats par groupe) (Figure III.1.2.4).

Figure III.1.2.4. Groupes étudiés et protocole expérimental.



III. 1. 2. 5. Critère d'évaluation principal et critères secondaires

Le critère de jugement principal était la PAPm évaluée au 28^{ème} jour postopératoire (D28), en insu.

Les critères de jugement secondaires comprenaient notamment l'hypertrophie du VD évaluée par l'indice de Fulton, comme décrit précédemment, et l'étude du remodelage et de la fonction cardiaque en échocardiographie.

Les analyses histologiques du remodelage vasculaire pulmonaire n'étaient réalisées qu'en présence d'une différence significative d'hypertension pulmonaire ou de remodelage cardiaque droit entre les deux groupes, « sauvage » et « $\Delta 71$ ».

III. 1. 3. ETUDE E3 (PROJET D'ETUDE) : APPORT DE NOUVELLES TECHNIQUES DANS LA CARACTERISATION DU REMODELAGE VASCULAIRE PULMONAIRE ET CARDIAQUE APRES PNEUMONECTOMIE DROITE CHEZ LE RAT.

III. 1. 3. 1. Rationnel de l'étude

L'objectif de cette partie était d'améliorer le modèle expérimental de pneumonectomie droite chez le rat en y intégrant d'autres outils d'évaluation. En effet, entre la mise au point du modèle (2015-2016) et les dernières expériences à l'animalerie (2019-2020), le laboratoire avait acquis plusieurs outils diagnostiques d'un intérêt majeur, comme par exemple une nouvelle machine d'échographie (Vevo™ 3100 qui remplaçait le Vevo™ 2100, VisualSonics®, Fujifilm®, Tokyo, Japan) acquise par la plateforme IPAM (Imagerie du Petit Animal Montpellier, Pierre Sicard/Sylvain Richard), ou encore les sondes Millar® pour réaliser des boucles pression-volume (Millar® research products, Texas, USA). D'autre part, certaines expériences sont trop consommatrices de temps ou trop coûteuses pour être incorporées initialement au modèle expérimental.

Finalement, cette étude n'a pu être réalisée pour différentes raisons, mais voici les grandes lignes des explorations que nous souhaitions mener, certaines au sein du laboratoire, et d'autres avec des collaborations extérieures.

III. 1. 3. 2. Explorations complémentaires

III. 1. 3. 2. 1. Exploration du remodelage cardiaque et de la fonction cardiaque droite

Intégration de nouveaux outils de mesure échographiques :

- Le Doppler tissulaire (DTI, *Doppler Tissue Imaging*) permet de mesurer les vitesses tissulaires, pour évaluer la contraction ainsi que la relaxation du ventricule. Il permet d'évaluer la fonction diastolique du VD notamment.
- Le 2D-*strain* global du ventricule droit (RV-GLS, *right ventricle longitudinal strain*) et le 2D-*strain* de la paroi libre du VD (RVLW *lateral wall longitudinal strain*) sont des indices qui pourraient s'altérer précocement dans la dysfonction VD. Le *strain* est probablement plus sensible et plus précoce que les autres indices de fonction systolique, ce qui a déjà été prouvé dans l'HTAP idiopathique [58], et dans notre étude « RESECHO ».
- L'IRM cardiaque est devenue l'examen « *gold standard* » pour l'évaluation des volumes cardiaques, de la fonction systolique, et de la fibrose ; surtout pour l'étude du ventricule droit dont la morphologie particulière est plus difficile à étudier que le VG en échographie.

- La boucle pression-volume (*PV loop*) par cathétérisme jugulaire droit (cathéter Millar®, Millar research products®, Texas, USA) est la technique de référence pour l'évaluation de la fonction systolique et diastolique du VD, par la mesure de l'élastance télé-systolique du VD (Ees) et de l'élastance artérielle (Ea) (logiciel LabChart™, AD instruments®, Sydney, Australia).
- Le Holter ECG permettrait d'étudier l'incidence des troubles du rythme supra-ventriculaire spontanés, déterminés entre D0 et D28. A D28, il était question d'étudier la susceptibilité des rats pneumectomisés aux troubles du rythme supra-ventriculaires par manœuvres provoquées, en collaboration avec Jérôme Thireau (PhyMedExp, Université de Montpellier).

III. 1. 3. 2. 2. Exploration de la fonction respiratoire

La pléthysmographie permettrait de déterminer les volumes pulmonaires, afin d'évaluer l'adaptation fonctionnelle respiratoire après pneumectomie. En effet, il est décrit dans plusieurs études expérimentales, une croissance du poumon controlatéral après pneumonectomie, avec comme principal mécanisme une réactivation de facteurs de croissance fœtaux [116–119]. La croissance du poumon controlatéral est certainement un mécanisme protecteur vis-à-vis de l'HTP post-pneumonectomie, raison pour laquelle son évaluation est pertinente.

III. 1. 3. 2. 3. Exploration de la tolérance cardio-respiratoire à l'effort

Une épreuve d'effort sur tapis roulant électrique permettrait d'évaluer l'adaptation cardiorespiratoire à l'effort dans les groupes sham et PN, afin de démontrer le retentissement de la pneumonectomie droite et de l'HTP sur la tolérance à l'exercice.

III. 1. 3. 3. Statistiques et nombre de rats nécessaires

Seul le cathétérisme cardiaque réalisé pour la détermination des boucles P/V nécessite le sacrifice de l'animal à la fin de l'expérience. Pour cela, nous prévoyions que ces expériences pouvaient être menées chez 20 rats au total, 10 dans le groupe PN et 10 dans le groupe sham.

III. 2. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE II THERAPEUTIQUE

III. 2. 1. ETUDE T1 : PRE-CONDITIONNEMENT PULMONAIRE EN PREVENTION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE DROITE CHEZ LE RAT.

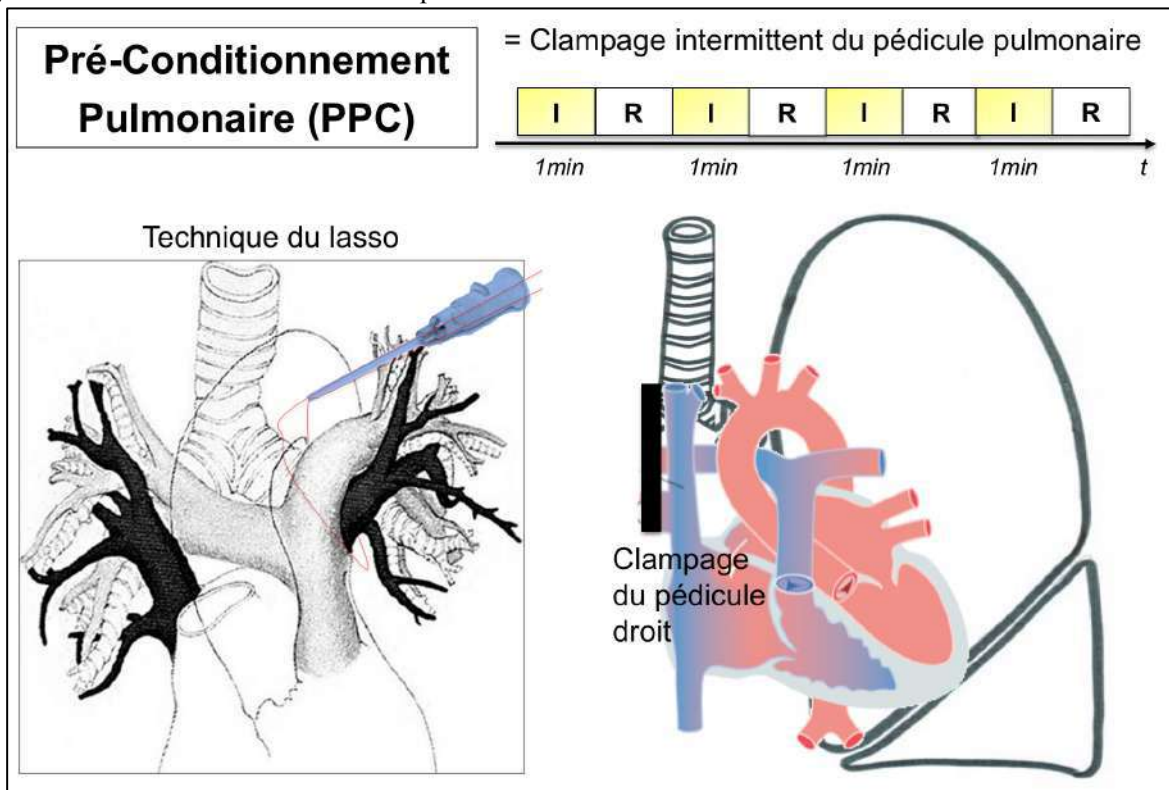
III. 2. 1. 1. Hypothèse de travail

Le pré-conditionnement pulmonaire (PPC) est défini comme une succession de séquences d'ischémie - reperfusion du poumon à résecter. Notre hypothèse de travail était que le PPC pouvait prévenir l'HTP induite par la pneumectomie droite chez le rat.

III. 2. 1. 2. Pré-conditionnement pulmonaire

Dans le groupe PPC, le pré-conditionnement pulmonaire était réalisé par voie chirurgicale et consistait en un clampage intermittent du pédicule pulmonaire droit (homolatéral à la résection) sur une minute, suivi d'un déclampage d'une minute. Le clampage était réalisé par un fil Vicryl® 4.0 selon la méthode du lasso à l'aide d'un cathlon. La séquence ischémie-reperfusion était répétée 4 fois (Figure III.2.1.2).

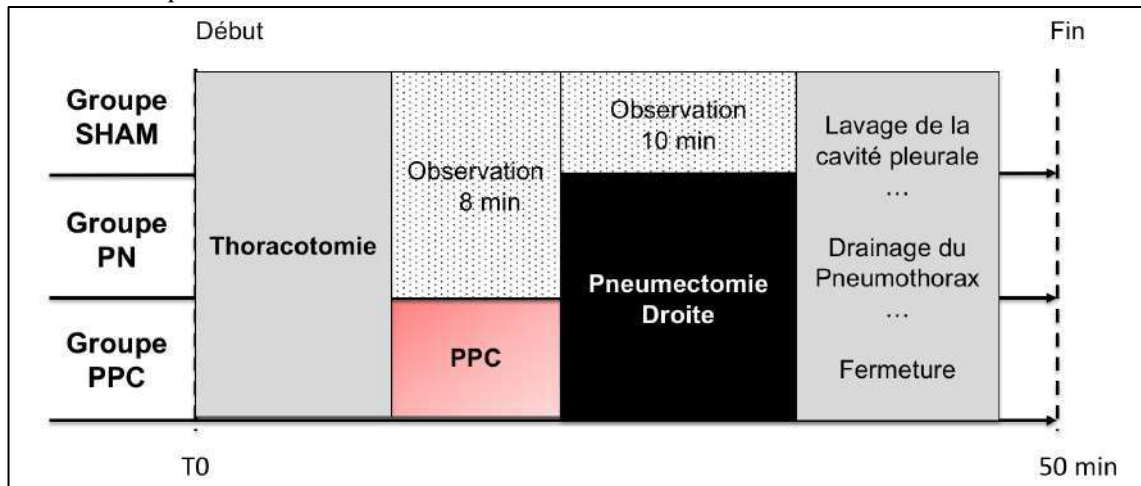
Figure III.2.1.2. Pré-conditionnement pulmonaire



III. 2. 1. 3. Groupes étudiés et protocole expérimental

Le protocole anesthésique et chirurgical était strictement identique à celui décrit précédemment dans le modèle expérimental. Trois groupes de dix rats étaient nécessaires, dix dans le groupe sham, 10 dans le groupe PN, et 10 dans le groupe PPC (Figure III.2.1.3).

Figure III.2.1.3. Protocole expérimental pour l'étude des effets du pré-conditionnement pulmonaire (PPC) dans le modèle de pneumectomie droite chez le rat.



PN : pneumectomie ; PPC : pré-conditionnement pulmonaire

III. 2. 1. 4. Critères d'évaluation et calcul du nombre d'animaux nécessaires

Le critère de jugement principal initialement prévu était la PAPm évaluée au 7^{ème} jour postopératoire (D7), en insu.

Nous espérons une réduction de PAPm de 25% au 7^{ème} jour postopératoire avec le PPC. Pour mettre en évidence une réduction de PAPm de 10 mmHg entre le groupe PN (PAPm attendue de 35mmHg) et PPC (PAPm attendue 25mmHg), en maîtrisant le risque α et β ($\alpha = 0.05$, $1-\beta = 0.9$, $\delta = 10$ mmHg, $SD = 5$ mmHg), il était nécessaire d'inclure 10 rats par groupe.

Les critères de jugement secondaires comprenaient notamment l'hypertrophie du VD évaluée par l'indice de Fulton, comme décrit précédemment, et l'étude du remodelage cardiaque en échocardiographie.

Le critère « mortalité » était ajouté secondairement comme élément de tolérance du traitement.

III. 2. 2. ETUDE T2 : PREVENTION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE DROITE CHEZ LE RAT PAR UN INHIBITEUR SELECTIF DU RECEPTEUR AU *PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR*-BETA.

Ce protocole a fait l'objet d'un dépôt de dossier de demande de Bourse de Master dans le cadre de l'appel à projet MUSE : biomarkers and therapy 2018-2019 (refusé).

III. 2. 2. 1. Rappel du rationnel de l'étude

III. 2. 2. 1. 1. Rationnel basé sur la littérature

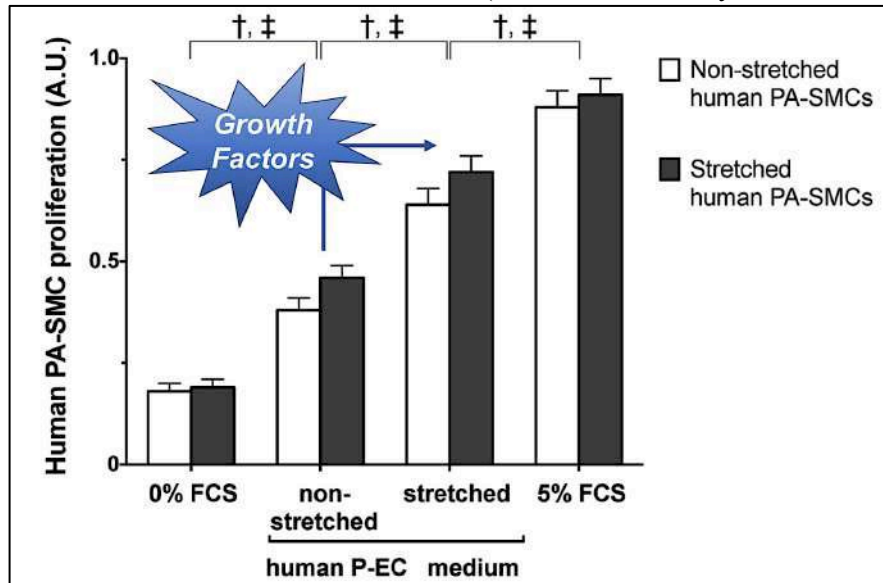
Plusieurs facteurs de croissance ont été mis en cause dans la physiopathologie de l'HTAP idiopathique, notamment dans la prolifération et la migration anormales des cellules musculaires lisses, comme l'EGF, le FGF2, et le PDGF [92–94]. Il y a de nombreuses évidences dans la littérature pour affirmer que le « *shear stress* » influe de façon privilégiée sur l'expression du PDGF [98,100–102]. Ainsi, on retrouve dans la séquence du promoteur du PDGF un « *cis-acting fluid shear-stress-responsive element* », qui s'active lorsque la cellule est soumise au shear stress [103]. L'imatinib (STI571 ou Glivec®), un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase non sélectif de la voie PDGF, était une piste thérapeutique prometteuse dans l'HTAP [104,105]. Seulement, son utilisation chez l'homme s'est révélée délétère dans les essais randomisés réalisés sur de larges cohortes de patients. Les effets délétères étaient probablement en lien avec l'absence de sélectivité pour la voie PDGF. A la lumière de ces données, l'inhibition sélective de la voie PDGF, plus particulièrement du récepteur PDGFR-béta surexprimé dans l'HTAP, paraissent particulièrement pertinent dans notre modèle.

III. 2. 2. 1. 2. Arguments fournis par les résultats du modèle de shear stress cellulaire

Dans le modèle de *shear stress* développé sur cellules endothéliales pulmonaires et cellules musculaires lisses humaines (Etude E1) [120], nous avons mis en évidence un effet stimulant des facteurs de croissance sécrétés par les cellules endothéliales « *stretchées* » sur la croissance des cellules musculaires lisses humaines (Figure III.2.2.1.2 ci-après, Figure 7 de la publication [120]).

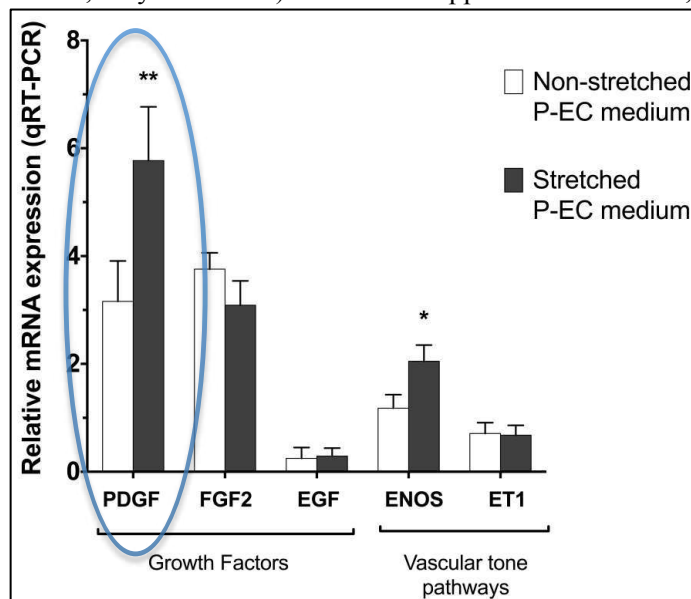
Le résultat du dosage par qRT-PCR des facteurs de croissance dans les cellules endothéliales « *stretchées* » et « *non stretchées* » a montré une surexpression de PDGF (Figure III.2.2.1.2.1 ci-après, Supplementary Figure 4 dans la publication [120]). Dans notre modèle animal, la pneumonectomie droite résulte inévitablement en un hyperdébit sanguin dans le réseau vasculaire pulmonaire restant, donc à un *shear stress* pour les cellules endothéliales pulmonaires tapissant les vaisseaux. Comme nous avons montré que la voie PDGF était particulièrement stimulée en cas de *shear stress*, il était d'autant plus pertinent de tester notre antagoniste sélectif du PDGF dans ce modèle.

Figure III.2.2.1.2 (Figure 7 de la publication [120]). Impact du shear stress sur la prolifération humaine de PA-SMCs. Quantification de la prolifération des PA-SMCs humaines exposées (PA-SMC « stretchées », barres grises) ou non (PA-SMC « non stretchées », barres blanches) à une stimulation cyclique pathologique de 24 h, cultivées dans 4 milieux de culture différents: en présence de surnageant de P-ECs exposées (P-EC « stretchées ») ou non (P-EC « non stretchées ») à un étirement cyclique pathologique sur 24h, et dans des milieux témoins (0% ou 5% FCS, prolifération minimale et maximale respectivement). Tests ANOVA bidirectionnels avec correction de Sidak (unité arbitraire, moyenne \pm SD, 10 échantillons).



A.U.: unité arbitraire; FCS: sérum de veau foetal; PA-SMC: cellule musculaire lisse artérielle pulmonaire; P-EC: cellule endothéliale pulmonaire.

Figure III.2.2.1.2.1. (Supplementary Figure S4 dans la publication [120]): Quantification du niveau d'ARN messager dans les P-ECs « stretchées » (barres grises) ou les P-ECs « non stretchées » (barres blanches) après 24h de stimulation par étirement cyclique mécanique dans le système FlexCell. Le niveau d'expression des gènes d'intérêt a été calculé par rapport au niveau d'expression de l'ARNm du standard interne r18S (unités arbitraires, moyenne \pm SD). Tests t non appariés: valeur $P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**).



[PDGF = facteur de croissance dérivé des plaquettes; FGF2 = facteur de croissance basique des fibroblastes; EGF = facteur de croissance épidermique; ENOS = oxyde nitrique synthase endothéliale; ET1 = endothéline 1; P-EC = cellule endothéliale pulmonaire].

III. 2. 2. 2. Détermination du rôle du PDGF-B sur son récepteur PDGFR-béta dans l'HTAP

Des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (PA-SMCs) ont été isolées chez des patients atteints d'HTAP idiopathique et chez des patients contrôles. L'expression génique des récepteurs au PDGF alpha et béta était explorée par q-RT-PCR

Ensuite, nous avons quantifié les formes phosphorylées des récepteurs PDGFR-alpha et PDGFR-béta par *Western Blot*, dans les PA-SMCs de sujets sains et sujets HTAP, en présence ou non du ligand PDGF-B. Les PA-SMCs ont étéensemencées dans du milieu + FCS et cultivées à 70-80% de confluence. Ensuite, le milieu a été retiré et les cellules ont été soumises à un arrêt de croissance par incubation avec un milieu sans sérum. Après 48 heures, les PA-SMCs ont été incubés pendant 30 minutes en présence de PDGF-B (10 ng/ml). Les cellules ont ensuite été collectées et la concentration en protéines a été déterminée en utilisant le kit Protein Assay Bicinchoninate™ (Interchim®, Montluçon, France), et 10 µg d'extrait protéique ont été utilisés pour l'analyse par transfert Western. L'immunotransfert a été réalisé avec les récepteurs polyclonaux de lapin anti-phospho-PDGF humains. La détection a été réalisée avec un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (1/5000, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, USA), et les bandes immunoréactives ont été visualisées en utilisant le réactif de chimiluminescence améliorée (ECL, Bio Rad laboratories®), Hercules, USA), et quantifiées par analyse densitométrique.

Les voies de signalisation du PDGF-B sur son récepteur PDGFR-béta ont été explorées, notamment STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) et sa forme phosphorylée pSTAT3, pERK (*extracellular signal-regulated kinase*) et HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*).

III. 2. 2. 3. Développement d'un inhibiteur sélectif du PDGFR-Béta

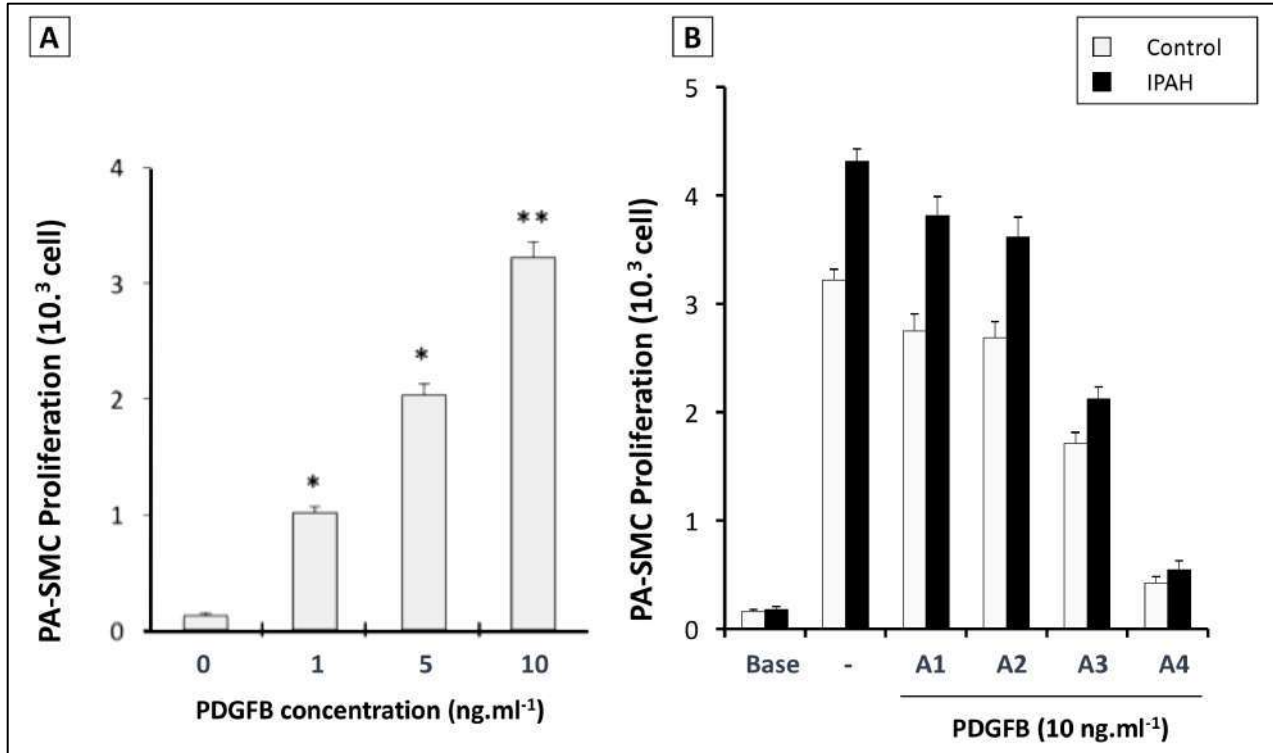
Les expériences précédentes ont montré que dans l'HTAP, ce sont surtout l'isoforme BB du PDGF et son récepteur PDGF-R β qui sont surexprimés dans le lit vasculaire pulmonaire et jouent un rôle clé. Ainsi, nous avons demandé aux chimistes de l'Institut des Biomolécules Max de Mousseron (Jean-Alain FEHRENTZ, PhD, IBMM, Montpellier, France), de synthétiser un antagoniste compétitif du PDGF-B sur son récepteur PDGFR-β. Les chimistes ont développé 4 peptides ayant des propriétés différentes sur l'inhibition du récepteur PDGFR-β, nommés A1, A2, A3, et A4.

III. 2. 2. 3. 1. Détermination de la concentration en PDGF-B à appliquer pour induire une prolifération maximale des cellules musculaires lisses

La concentration de PDGF-B à ensemercer dans le milieu de culture pour avoir une prolifération maximale des PA-SMCs était déterminée préalablement. Les PA-SMCs isolées à partir de sujets sains (barres gris clair), après une période sans sérum sans croissance de 48h, étaient mises en culture avec des doses

croissantes de PDGF-B (0, 1, 5, 10 ng/ml) pendant 48 heures, collectées et comptées. La concentration optimale en PDGF-B pour stimuler une prolifération maximale était de 10 ng/ml (Figure III.2.2.3.1A).

Figure III.2.2.3.1. (A) : Prolifération des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (PA-SMC) en présence d'une concentration croissante de PDGF-B dans le milieu de culture. (B) : Prolifération des PA-SMCs en présence de l'un des 4 inhibiteurs du PDGFR- β (nommés A1, A2, A3, A4) et d'une concentration fixe en PDGF-B.



PDGF : platelet derived growth factor ; PA-SMC : pulmonary artery smooth muscle cell

III. 2. 2. 3. 2. Evaluation de l'efficacité et de la spécificité de l'inhibiteur sélectif

L'efficacité et la spécificité de l'inhibiteur devaient être validées au préalable, *in vitro*, avant qu'il ne soit testé dans les modèles animaux.

Les 4 inhibiteurs ont été testés dans un modèle de culture cellulaire. Des PA-SMCs ont été isolées à partir de sujets sains (barres gris clair) ou de sujets atteints d'HTAP idiopathique (barres noires). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 24 puits à une densité de 10³ cellules par puits puis laissées dans un milieu sans sérum pour obtenir un arrêt de la prolifération pendant 48 heures. Ensuite, les cellules étaient cultivées dans différents milieux de culture, contenant un des 4 inhibiteurs du PDGFR- β (A1, A2, A3, A4), chacun à la même concentration, avec une concentration fixe de PDGF-B à 10 ng/ml dans le milieu. La prolifération des cellules était mesurée à 48 heures par MTT assay. Les expériences étaient réalisées sur 10 échantillons et chaque échantillon était analysé en « *triplicate* » (Figure III.2.2.3.1B).

Cette première phase nous a permis de déterminer que l'inhibiteur « A4 » était l'inhibiteur le plus puissant de la voie PDGF-B / PDGFR- β . C'est donc cet inhibiteur que nous avons ensuite testé dans notre modèle animal.

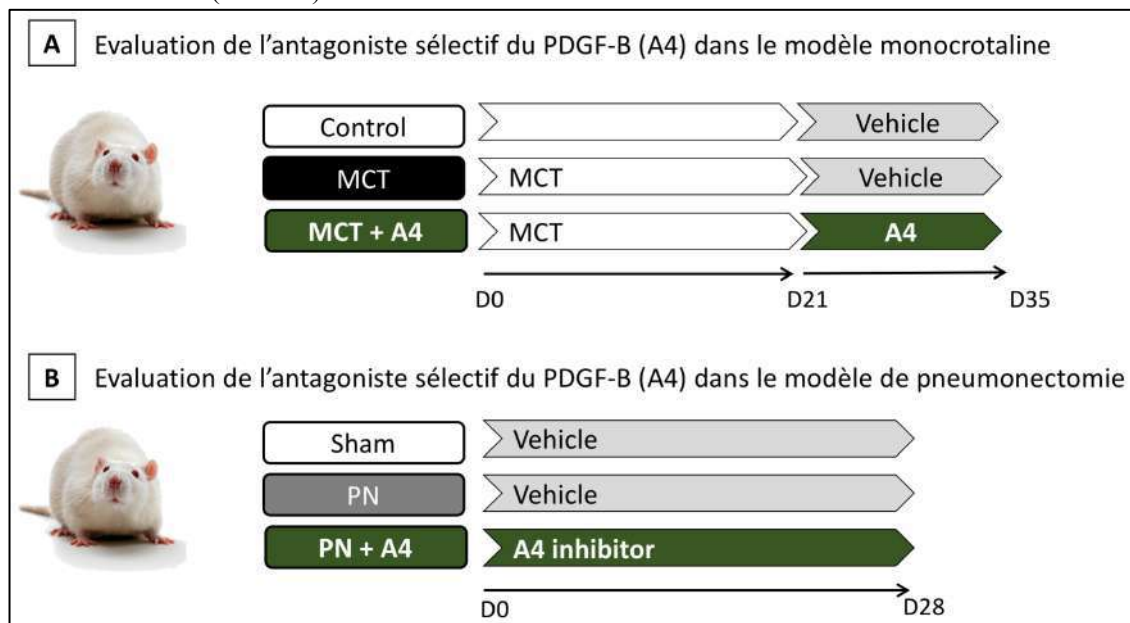
III. 2. 2. 4. Protocole expérimental et groupes étudiés

L'inhibiteur A4 était testé dans le modèle de pneumonectomie droite ainsi que dans le modèle monocrotaline qui servait de référence. Les rats traités par monocrotaline (MCT) recevaient une injection unique, comme décrit précédemment [45]. Les animaux étaient ensuite randomisés pour recevoir soit un placebo (groupe MCT, n = 10) soit l'inhibiteur A4 (groupe MCT + A4, n = 10) entre le 21^{ème} jour et le 35^{ème} jour après l'injection (Figure III.2.2.4A).

Dans le modèle de pneumonectomie droite, les rats étaient randomisés pour être traités soit par placebo (groupe PN, n = 10), soit par inhibiteur A4 (groupe PN + A4, n = 10) dès le jour de la chirurgie, jusqu'au 28^{ème} jour postopératoire (D28) (Figure III.2.2.4B).

L'inhibiteur A4 était administré à la même posologie, en une injection intra-péritonéale par jour. Nous avons envisagé l'administration au moyen de mini-pompes osmotiques sous-cutanées, mais le volume à administrer était trop important pour les 28 jours, non compatible avec les modèles de pompe sous-cutanée implantable chez le rat.

Figure III.2.2.4. Protocole expérimental et groupes étudiés : évaluation de l'antagoniste sélectif du PDGF-B (inhibiteur A4) dans le modèle monocrotaline (MCT) (Panel A) et dans le modèle de pneumonectomie (PN) droite chez le rat (Panel B).



PDGF : *platelet-derived growth factor* ; PN : pneumonectomie ; MCT : monocrotaline ; A4 : inhibiteur du récepteur au PDGF-béata, nommé A4.

III. 2. 2. 5. Critères d'évaluation

Le critère de jugement principal était la PAP moyenne mesurée par cathétérisme cardiaque droit. L'objectif statistique était de réduire la PAPm de 35 mmHg dans le groupe PN, à 25 mmHg dans le groupe traité par l'inhibiteur A4, ce qui avec un écart type de 7 mmHg, un risque alpha à 0.05 bilatéral et une puissance de 80%, nécessitait d'inclure 8 rats par groupe. Nous avons augmenté cet effectif à 10 rats par groupe.

Les critères de jugement secondaires étaient les mêmes que ceux décrits dans l'étude E1 [120]. Le remodelage cardiaque droit était évalué par l'indice d'hypertrophie du VD et échocardiographie.

III. 2. 2. 6. Explorations complémentaires

Nous projetions de mener des explorations complémentaires en immunohistochimie sur les coupes de poumons. L'expression du PDGF-B et de son récepteur PDGFR- β , ainsi que sa forme phosphorylée, pourraient être étudiée *in situ* en utilisant des anticorps spécifiques. Ajouter la technique « d'hybridation *in situ* » permettrait de marquer l'ARN messager PDGF dans les cellules endothéliales, afin de démontrer que les cellules endothéliales pulmonaires synthétisent davantage de PDGF-B chez les rats pneumonectomisés que chez les rats sham, afin d'appuyer le rationnel du traitement par anti-PDGF.

Enfin, la néoangiogénèse pourrait avoir des propriétés bénéfiques en diminuant le *shear stress* exercé sur les vaisseaux pulmonaires, par une redistribution d'une partie du débit cardiaque droit vers de nouveaux vaisseaux. Le PDGF étant un facteur de croissance vasculaire (comme le VEGF et l'angiopoïétine), nous avons émis l'hypothèse que l'anti-PDGF pourrait inhiber cette néoangiogénèse salvatrice. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, *in vivo*, nous voulions étudier la densité vasculaire chez les rats pneumonectomisés traités *vs.* non traités, par un immunomarquage CD31. *In vitro*, nous voulions compléter le modèle de *shear stress* cellulaire (FlexCell®) sur une matrice matrigel (Matrigel™ Matrix, Corning®, NY, USA), avec un traitement des cellules par l'anti-PDGF, pour évaluer les modifications de la croissance vasculaire induite par l'anti-PDGF.

III. 2. 3. ETUDE T3 : COMPARAISON DE TROIS TRAITEMENTS VASODILATATEURS PULMONAIRES DISPONIBLES PAR VOIE ORALE CHEZ L'HOMME, EN PREVENTION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE DROITE CHEZ LE RAT : SILDENAFIL, MACITENTAN, SELEXIPAG.

Pour ce projet d'étude thérapeutique « T3 », j'ai construit le protocole de l'étude et l'ai confié à Benjamin Bourdois, interne en Médecine inscrit au D.E.S. d'Anesthésie Réanimation. Benjamin a obtenu une bourse année-recherche auprès de la Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes pour réaliser son Master II dans l'Unité INSERM 1046 en 2019-2020. Le Master II était encadré par Saadia Eddahibi, Sylvain Richard, Pierre Sicard et moi-même (PhyMedExp).

Alors que nous avons débuté les expériences au Laboratoire, l'étude a dû être interrompue précocement. L'épidémie de COVID-19 a nécessité que les animaux des projets non prioritaires soient supprimés. Ce fût le cas pour notre projet, alors que les expériences étaient en cours sur le Sildénafil. Du fait de la disparition de Saadia Eddahibi, nous n'avons pas repris ces expériences, et Benjamin a dû interrompre son Master II prématurément.

III. 2. 3. 1. Rappel du rationnel de l'étude

Même si l'HTP et le remodelage VD sont bien décrits après résection pulmonaire, aucune étude expérimentale ou clinique n'a essayé de prévenir ce remodelage. Les molécules que nous souhaitions tester sont indiquées dans l'HTAP idiopathique chez l'homme et disponibles par voie orale : le Sildénafil, un inhibiteur de phosphodiesterase de type 5 ; le Macitentan, un antagoniste de l'Endothéline 1 ; et le Selexipag, un agoniste du récepteur de la Prostacycline. Notre hypothèse est qu'un traitement vasodilatateur pulmonaire (avec théoriquement aussi des propriétés antiprolifératives), administré précocement après pneumonectomie, inhibe le remodelage vasculaire et le développement d'HTP.

III. 2. 3. 2. Critères d'évaluation

III. 2. 3. 2. 1. Critère de jugement principal et calcul du nombre d'animaux nécessaires

Le critère de jugement principal était la PAP systolique à D28, évaluée en insu du groupe de randomisation, par cathétérisme jugulaire droit, sous anesthésie générale par Isoflurane.

Une diminution d'au moins 30% de la PAPs nous semblait cliniquement pertinente. Pour mettre en évidence une diminution significative de PAPs de 60 mmHg dans le groupe placebo à 40 mmHg dans le groupe traité, avec un écart type de 13 mmHg, un risque α de 5%, un risque β à 10%, il était nécessaire d'inclure 10 rats par groupe.

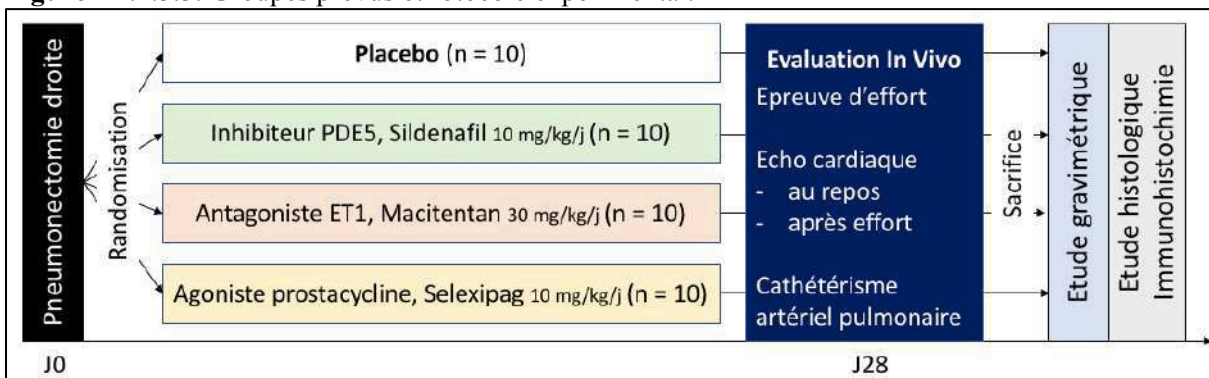
III. 2. 3. 2. Critères d'évaluation secondaires

- Echographie cardiaque : évaluation standardisée au repos, puis après l'effort (Vevo 3100™, VisualSonics, Fujifilm®, Tokyo, Japan). Les paramètres mesurés incluaient une évaluation par le 2D-strain.
- Etude gravimétrique après sacrifice de l'animal à J28, par injection létale intra-péritonéale de barbiturique. Mesure du poids du poumon gauche, poids du VD et du VG (indexés au poids corporel), et indice de Fulton.
- Epreuve d'effort sur tapis roulant électrique : durée de course avant fatigabilité de l'animal.
- Etude histologique : quantification de la muscularisation des artères pulmonaires distales et immunomarquages (cf. Etude E1, [120]).

III. 2. 3. 3. Plan expérimental

Les 40 animaux étaient randomisés dans l'un des 3 groupes thérapeutiques ci-dessous, ou dans le groupe Placebo (Figure III.2.3.3).

Figure III.2.3.3. Groupes prévus et protocole expérimental.



Perspectives de recherche

Si l'un des trois traitements est efficace en « préventif », il était prévu de le tester en « curatif », c'est à dire une fois l'HTP installée, entre D28 et D56, avec une évaluation à D56.

Si les trois classes thérapeutiques sont inefficaces en « préventif », il était prévu de tester chacune de ces trois classes en association soit avec l'inhibiteur sélectif du PDGFR-béta, soit associées entre elles, comme c'est le cas dans l'HTAP idiopathique chez l'homme, où la thérapie « combinée » de plusieurs vasodilatateurs pulmonaires est souvent nécessaire pour être efficace.



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Paris, le 23 juillet 2019

Objet : Notification de décision relative à l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Direction générale de la recherche et de l'innovation

Service de la performance,
du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des Fins Scientifiques - AFIS -

Affaire suivie par
Véronique Delassault
Responsable administrative
de la cellule AFIS

Tél : 01 55 55 97 27
veronique.delassault
@recherche.gouv.fr

autorisation-projet
@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#16723-2018091216342585 v3
- ayant pour titre : Hypertension artérielle pulmonaire et altérations de la fonction ventriculaire droite après pneumonectomie : étude du remodelage cardiaque et traitement préventif par vasodilatateurs pulmonaires chez le rat.
- déposé par l'établissement utilisateur : Unité de recherche Inserm U1046, numéro d'agrément A3417238, dont le responsable est Monsieur Jacques CAVAILLE,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par : Monsieur Sylvain RICHARD, Madame Saadia EDDAHIBI, Monsieur Olivier CAZORLA,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement utilisateur, pour une durée de 5 ans à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°036 et a reçu un avis favorable.

Ce projet fera l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective. Il vous appartiendra de prendre contact directement avec le comité d'éthique.

Pour la ministre et par délégation
l'adjoint au chef du service de la performance,
du financement et de la contractualisation
avec les organismes de recherche

Damien ROUSSET

Monsieur Jacques CAVAILLE
Unité de recherche Inserm U1046

III. 3. RECHERCHE CLINIQUE

III. 3. 1. ETUDE C1 : MODIFICATION PRECOCE DE LA FONCTION VENTRICULAIRE DROITE APRES CHIRURGIE DE RESECTION PULMONAIRE EVALUEE PAR LE 2D-STRAIN EN ECHOCARDIOGRAPHIE : UNE COHORTE PROSPECTIVE (RESECHO).

III. 3. 1. 1. Design de l'étude

Une étude prospective monocentrique a été conduite dans le Département d'Anesthésie Réanimation Arnaud de Villeneuve du CHU de Montpellier (France). L'étude était conforme aux normes éthiques énoncées dans la déclaration d'Helsinki de 1964. Une information orale et écrite sur le protocole de l'étude était fournie à tous les participants. Le Comité Régional d'Ethique a renoncé à la nécessité d'un consentement éclairé écrit (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I; *IDRCB 2016-A00322-49*). Le numéro d'enregistrement de l'étude clinique était *NCT03032900*.

III. 3. 1. 2. Critère d'éligibilité

Tous les patients consécutifs âgés de 18 ans ou plus, programmés au bloc opératoire pour une chirurgie de résection anatomique d'un cancer du poumon (c.-à-d. lobectomie, bi-lobectomie, pneumonectomie), étaient éligibles dans la présente étude. Les patients étaient inclus la veille de la chirurgie.

Les critères d'exclusion étaient l'hypertension pulmonaire préexistante ou une dysfonction VD préexistante documentée. Les patients refusant de participer ou présentant une complication postopératoire chirurgicale dans les trois jours suivant la chirurgie (par exemple, saignement nécessitant une ré-intervention) ont été secondairement exclus de l'analyse. Les patients ayant des échocardiogrammes de faible qualité ont également été secondairement exclus.

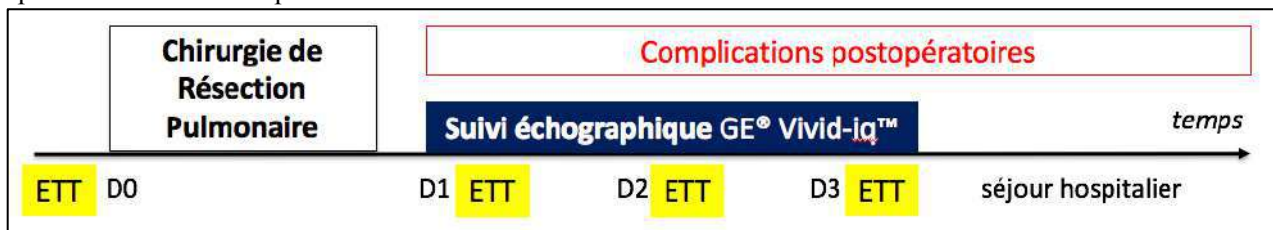
III. 3. 1. 3. Collection des données

Les données sociodémographiques ont été colligées. Les paramètres cliniques et biologiques ont été recueillis en péri-opératoire, notamment la pression artérielle moyenne, la fréquence cardiaque, le rythme cardiaque, l'apport en oxygène, le débit urinaire, la natrémie, le taux d'hémoglobine et le taux de créatinine sérique. Les complications postopératoires, la durée du séjour à l'hôpital, la mortalité intra-hospitalière étaient recueillies. La pneumonie postopératoire était définie selon les recommandations américaines [121]. La fibrillation atriale était examinée sur un ECG quotidien.

III. 3. 1. 4. Protocole d'échocardiographie trans-thoracique (ETT)

Un examen d'échographie cardiaque par voie trans-thoracique (ETT) standardisé était réalisé par le même médecin, référent en ETT, avec le même échographe (General Electric®, Vivid™ iq, Boston, USA), la veille de la chirurgie (D0, *baseline*) et au premier, deuxième et troisième jour postopératoire (D1, D2 et D3 respectivement) (Figure III.3.1.4.1). Au cours de l'ETT, tous les patients étaient en ventilation spontanée, installés en décubitus latéral gauche. Aucun agent de contraste échographique n'était utilisé.

Figure III.3.1.4.1. Description du protocole de suivi dans notre étude de cohorte menée chez les patients opérés d'une résection pulmonaire.

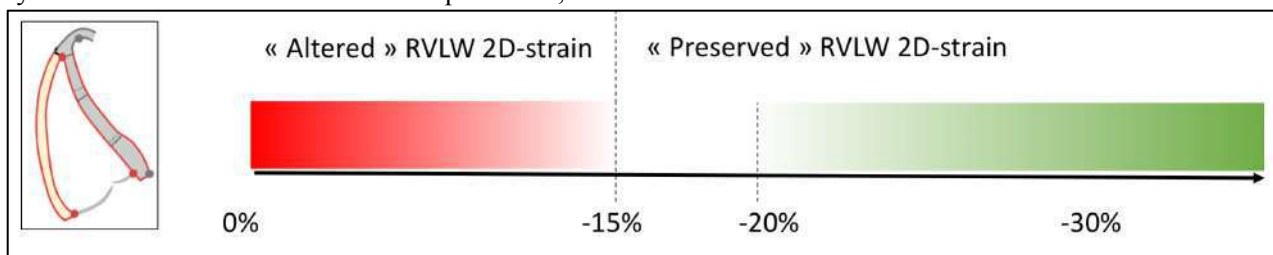


ETT : échographie cardiaque trans-thoracique ; D0, D1, D2 D3 : baseline, 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} jours postopératoires.

La déformation longitudinale bidimensionnelle de la paroi latérale du VD (*RVLW 2D-strain*) était calculée avec le logiciel embarqué sur la machine d'échographie (General Electric®, Automated Function Imaging™ 2.0). La qualité de l'échocardiogramme était évaluée sur une vue « quatre cavités » (4C) centrée sur le VD. Pour être inclus, il était nécessaire de visualiser l'ensemble des parois du VD, surtout la paroi latérale, avec un endocarde bien défini et un tracé ECG. La région d'intérêt était construite en disposant manuellement 3 à 6 points sur l'endocarde de la paroi latérale du VD, puis la position des points était ajustée pour permettre un suivi optimal de la déformation longitudinale (Figure I.4.1.5.2, dans la section Introduction). Les patients ayant des échocardiogrammes de faible qualité ont été exclus secondairement.

Les patients ont été ensuite classés en deux catégories, ceux avec un *RVLW 2D-strain* altéré (supérieur ou égale à -15%, ou inférieur à 15% en valeur absolue) et ceux avec un *RVLW 2D-strain* préservé (strictement inférieur à -15%, ou supérieur à 15% e valeur absolue) (Figure III.3.1.4.2).

Figure III.3.1.4.2. Classement des patients en deux groupes : ceux ayant une valeur de 2D strain de la paroi libre du ventricule droit (*RVLW 2D-strain*) altérée, c'est à dire supérieur ou égal à -15%, et ceux ayant une valeur de *RVLW 2D-strain* préservée, c.à.d. strictement inférieur à -15%.



La pression artérielle pulmonaire systolique (PAPs) était estimée par le gradient de régurgitation valvulaire tricuspide auquel était ajoutée la pression estimée de l'oreillette droite (POD). La POD était évaluée à partir du diamètre de la veine cave inférieure et son pourcentage de déformation en ventilation spontanée. Tous les paramètres échographiques étaient moyennés sur 3 mesures, à l'exception de la vitesse maximale de régurgitation tricuspide pour laquelle la valeur maximale était considérée comme la plus précise.

III. 3. 1. 5. Critères de jugement

Le critère d'évaluation principal était l'altération du *RVLW 2D-strain* au cours des 72 premières heures après la chirurgie, définie par une valeur supérieure ou égale à -15% (ou inférieure à 15% en valeur absolue).

Les critères d'évaluation secondaires étaient l'altération des autres paramètres de fonction systolique du VD, tels qu'un TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*) inférieur à 12 mm, une onde S à l'anneau tricuspide en DTI (*Doppler Tissue-Imaging*) inférieure à 10 cm.s⁻¹, ou une dilatation du VD mesurée par une surface télé-diastolique du VD (STDVD) supérieure à 12 cm². m⁻². Une PAP systolique supérieure à 35 mmHg définissait l'hypertension pulmonaire dans cette étude.

III. 3. 1. 6. Analyses statistiques

A partir de données préliminaires non publiées (Etude POP, Culas *et al.*, abstract présenté au congrès *EACTA* 2012), nous avons d'abord estimé que 30% des patients de la cohorte allaient développer un *RVLW 2D-strain* altéré après chirurgie de résection pulmonaire. L'incidence de l'événement « *RVLW 2D-strain* altéré » était déterminée par un pourcentage associé à un intervalle de confiance à 95% (IC95). Pour avoir un IC95 avec une précision de $\pm 10\%$, considérant un risque alpha de 5%, le nombre de sujets à inclure était de 81 patients.

D'abord, la population de l'étude était décrite. Les caractéristiques des deux groupes, « *RVLW 2D-strain* altéré » et « *RVLW 2D-strain* préservé » ont été comparées. Les variables qualitatives ont été exprimées en nombre (pourcentage) et testées à l'aide du test du chi deux. Pour les variables quantitatives, la normalité de la distribution était testée par le test de *Shapiro-Wilk*, et les données ont été exprimées en moyenne (écart type, SD) ou en médiane (IQR, *interquartile range*).

L'évolution des paramètres mesurés dans le temps était analysée à l'aide de modèles mixtes sur mesures répétées. Les facteurs de risque de développement d'un *RVLW 2D-strain* altéré ont été recherchés. Des analyses univariées ont d'abord été effectuées. Des tests du chi deux ont été réalisés pour analyser le lien entre les variables qualitatives. Les moyennes ont été comparées à l'aide des tests de *Student* pour les variables de distribution gaussienne et de *Mann-Whitney-Wilcoxon* pour les variables non gaussiennes. La

sélection des variables à inclure dans le modèle multivarié était effectuée à l'issue des analyses univariées au seuil de 0.20. Une régression logistique multivariée étape par étape était réalisée. Les résultats sont présentés par un *Odds-Ratio* ajusté avec un IC95.

Les valeurs de P calculées inférieures ou égales à 0.05 étaient considérées statistiquement significatives pour tous les tests bilatéraux. L'analyse statistique était réalisée en utilisant le logiciel Prism 8 TM (GraphPad®, La Jolla, USA) et SAS TM (SAS Institute®, Cary, USA).

COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES SUD MÉDITERRANÉE I

Président
Professeur Yves JAMMES

Marseille, le 14 septembre 2016

Madame Sandrine BARBAS
Direction de la recherche et de l'Innovation
Hôpital La Colombière
Pavillon 32-Secteur Essais Cliniques
39, av. Charles Flahault
34295 MONTPELLIER Cedex 5

- Objet : Avis favorable
- Référence du Comité : 16 72
- Votre référence : 97 40
- Numéro d'identification : 2016-A01343-48

Madame,

Nous avons le plaisir de vous faire parvenir ci-joint l'avis favorable relatif au protocole de recherche biomédicale intitulé :

« INCIDENCE DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE APRES CHIRURGIE DE RESECTION PULMONAIRE, UNE ETUDE PROSPECTIVE. »

promu par le CHU de Montpellier et dont Madame le Dr Géraldine CULAS est l'investigateur coordonnateur.

Parmi l'ensemble des dispositions du Code de la Santé Publique qui régissent les relations ultérieures entre le promoteur et le Comité, nous attirons votre attention sur les points suivants :

- ❖ le présent avis favorable ne porte que sur les documents mentionnés sur l'avis, et il vous appartiendra de saisir le Comité pour toute modification substantielle que vous seriez amené à envisager ;
- ❖ le Comité devra recevoir la notification de la date effective de commencement de la recherche (signature du consentement de la première personne incluse en France) ;
- ❖ en cas d'absence de début de la recherche dans le délai d'un an après la date du présent avis favorable, celui-ci deviendrait caduque sauf prorogation accordée par le Comité.

Je vous prie d'agréer, Madame, l'expression de ma considération.



Professeur Y. JAMMES

III. 3. 2. ETUDE C2 (PROJET D'ETUDE) : RETENTISSEMENT DES RESECTIONS PULMONAIRES MAJEURES SUR LE COUPLAGE VENTRICULO-ARTERIEL DU VENTRICULE DROIT ET LA TOLERANCE A L'EFFORT A 6 MOIS : UNE ETUDE DE COHORTE PROSPECTIVE BICENTRIQUE (ETAP STUDY : *EXERCISE TOLERANCE AFTER PULMONARY RESECTION SURGERY*).

III. 3. 2. 1. Rappel du contexte et hypothèse de travail

Si l'HTP après pneumonectomie est inconstante chez l'homme, nous pensons que le lit vasculaire pulmonaire est pathologique dans 100% des cas, par l'altération de ses capacités de recrutement et de distension face à une augmentation de débit cardiaque à l'effort. Chez les patients ne développant pas d'HTP au repos après pneumonectomie, il est probable qu'une augmentation de débit cardiaque liée à l'effort démasque une HTP et une dysfonction VD survenant spécifiquement « à l'effort ». Cette hypothèse est cohérente avec la clinique, puisque les patients décrivent une intolérance à l'effort avant que n'apparaissent des symptômes au repos. Cette intolérance à l'effort peut altérer significativement la qualité de vie des patients. Dans la littérature, les études sont peu nombreuses sur ce sujet. Dans l'HTAP idiopathique, il est clairement démontré qu'une faible valeur de VO_2 max, ou une faible variation de débit cardiaque à l'effort, étaient des facteurs pronostics indépendants [68]. Après chirurgie de résection pulmonaire, seule l'étude d'Okada *et al.* rapportait une HTP d'effort chez une dizaine de patients évalués trois semaines après une chirurgie de résection pulmonaire [40]. Cette hypothèse de travail n'a encore jamais été explorée à distance de la chirurgie. Nous proposons d'étudier le couplage ventriculo-artériel du VD et la tolérance à l'effort 6 mois après chirurgie de résection pulmonaire majeure.

III. 3. 2. 2. Design de l'étude

Etude de cohorte prospective bi-centrique menée à l'Hôpital Arnaud de Villeneuve (CHU de Montpellier, France) et à l'Hôpital Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France) (Figure III.3.2.2).

III. 3. 2. 3. Population étudiée

Critères d'inclusion

Seront éligibles, les patients adultes opérés d'une chirurgie de résection pulmonaire majeure (lobectomie, bilobectomie, pneumonectomie) dans l'un des deux centres de l'étude.

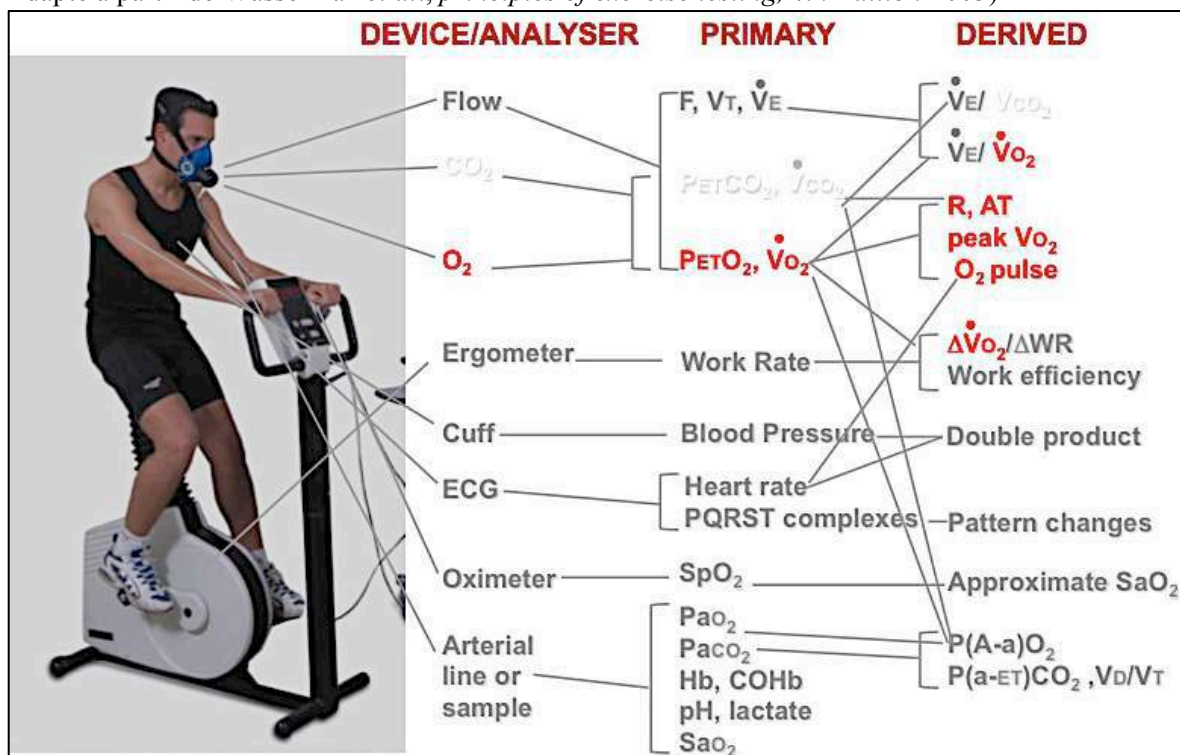
Critères d'exclusion

Pour être éligible, les patients ne devront présenter aucun des critères suivants : patient mineur ou incapable majeur, incapacité à réaliser les tests à l'effort (exemples : AOMI sévère, handicap physique lourd, rétrécissement aortique serré), hypertension pulmonaire préopératoire.

Critère de sortie d'études

Seront exclus secondairement de l'analyse, les patients ayant retiré leur consentement, ou ayant présenté une déviation importante au protocole (décision de l'investigateur), ou en cas de décès avant la fin du suivi.

Figure III.3.2.3. Test d'exercice cardio-pulmonaire ou épreuve d'effort sur bicyclette ergométrique (CPET, *cardio-pulmonary exercise test*) : paramètres mesurés, et paramètres calculés dérivés des mesures. Adapté à partir de Wasserman *et al.*, *principles of exercise testing*, 4th Edition 2005)



III. 3. 2. 4. La VO₂ maximale comme critère de jugement principal

La capacité maximale à l'effort exprimée en consommation maximale d'oxygène (VO₂ max) a été le premier paramètre ergométrique préopératoire à être associé au pronostic postopératoire et à la mortalité après résection pulmonaire. La valeur relative (exprimée en pourcentage de la valeur théorique pour l'âge et le sexe) a été remplacée par la valeur absolue de la consommation maximale d'oxygène, mesurée en ml/kg/min. La VO₂ max est le paramètre préopératoire le plus fiable pour stratifier le risque postopératoire [122]. Par exemple, en cas de VO₂ max < 10 ml/kg/min, le risque de résection pulmonaire majeure est jugé trop élevé, et le patient doit être adressé au chirurgien ou à l'oncologue pour une résection mineure ou un traitement non chirurgical alternatif.

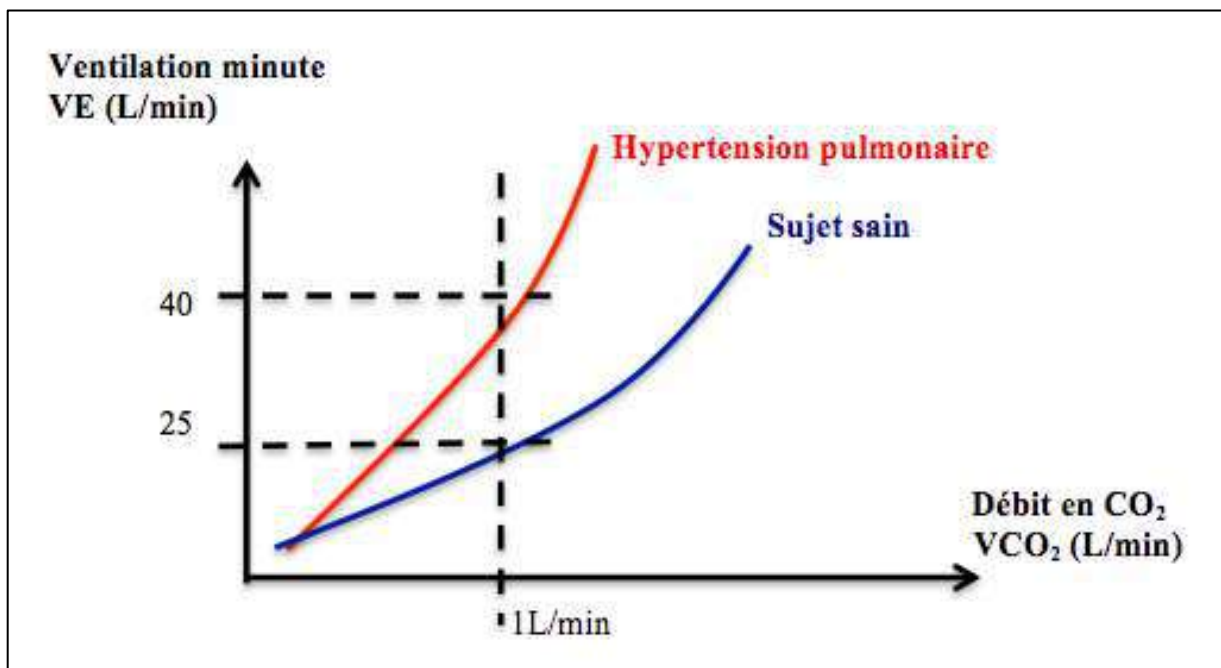
Nous avons choisi ce paramètre comme critère de jugement principal car la mesure est objective et reproductible, et a une relevance clinique majeure.

III. 3. 2. 5. Intervention et paramètres étudiés

Evaluation préopératoire (*baseline*), au 3^{ème} jour (D3) et 6^{ème} mois (M6) après la chirurgie par :

- Une épreuve d'effort cardio-pulmonaire sur bicyclette ergométrique (CPET, *cardiopulmonary exercise testing*, [Figure III.3.2.3](#)) avec mesure de la VO_2 max (exprimé en ml/kg/min), et calcul de la pente du rapport ventilation minute sur débit de CO_2 expiré (VE / VCO_2 slope, sans unité, [Figure III.3.2.5](#)).

Figure III.3.2.5. Représentation schématique du rapport VE / VCO_2 chez le sujet sain et chez le sujet atteint d'hypertension pulmonaire.



- Une échocardiographie trans-thoracique au repos et à l'effort. L'ETT au repos est de pratique courante, indolore, et sans conséquence clinique pour le patient. Elle ne ralentira pas sa prise en charge habituelle. L'ETT à l'effort devra être faite immédiatement après l'épreuve d'effort sur bicyclette ergométrique, au laboratoire d'échographie. Mesure des dimensions du VD et de la fonction VD à l'effort, du RVLW-2D *strain*, et estimation de la PAP à l'effort par le flux d'insuffisance tricuspiddienne.

- Un test de marche de 6 minutes (6MWT, *6 minutes walking test*) : on mesure la distance maximale parcourue en 6 minutes.

- Une épreuve fonctionnelle respiratoire avec pléthysmographie : avec mesure du volume expiratoire maximale en une seconde (VEMS), de la capacité vitale (CV) et la capacité pulmonaire totale (CPT). La

capacité de diffusion du CO sera également mesurée (DLCO, *diffusion capacity of carbon monoxide*). Le but est de mesurer la participation de la ventilation dans l'intolérance à l'exercice.

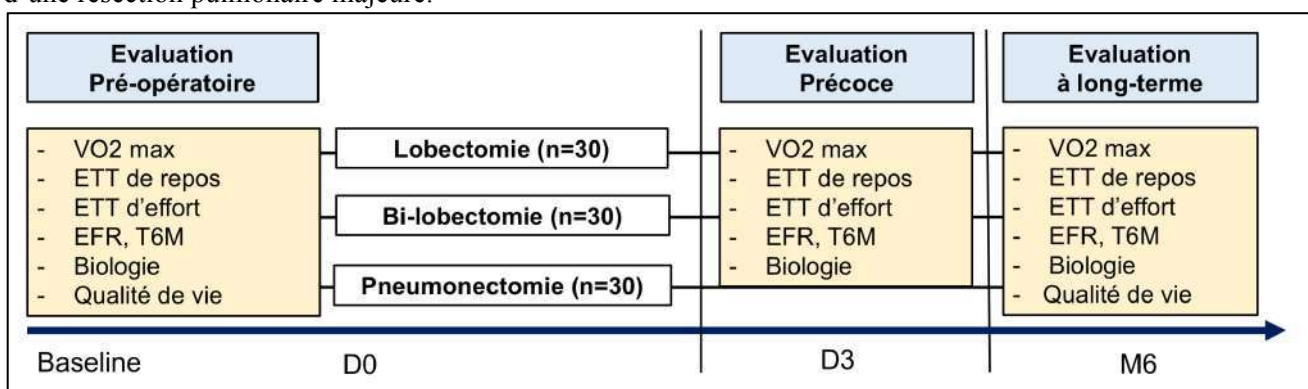
- Un bilan biologique pour doser des marqueurs de l'inflammation et de l'angiogenèse pouvant influencer le remodelage vasculaire pulmonaire. Centrifugation du plasma et cryoconservation.
- Un examen physique: évaluation des symptômes au repos, et symptômes à l'effort, recueil des complications postopératoires.
- Auto-questionnaires SF-36 et le WHOQOL, permettant d'évaluer la qualité de vie. Ces scores ont été validés pour des populations allant de 18 à 75 ans. Le questionnaire généraliste sur la qualité de vie SF-36 comprend 36 questions. Le questionnaire WHOQOL-BREF comprend 26 questions, permettant d'évaluer la qualité de vie et le retentissement psycho-social d'une pathologie.

Les données peropératoires seront également recueillies : paramètres vitaux peropératoires, réglages de la ventilation mécanique, remplissage vasculaire, complications peropératoires, type d'analgésie, durée opératoire et durée d'exclusion pulmonaire.

Les temps d'évaluation ont été choisis pour correspondre au mieux au parcours habituel de soin du patient opéré de résection pulmonaire, afin de limiter au maximum les perdus de vue :

- L'évaluation au 3^{ème} jour correspond en général au dernier jour d'hospitalisation chez nos patients. On peut donc envisager ce bilan avant le retour à domicile.
- L'évaluation au 6^{ème} mois sera réalisée le même jour que la consultation chirurgicale de suivi postopératoire, au cours d'une hospitalisation de jour (HDJ) qui sera prévue spécifiquement pour la réalisation de l'ensemble de ces examens.

Figure III.3.2.2. Design de l'étude et protocole de suivi pré- et postopératoire chez les patients opérés d'une résection pulmonaire majeure.



III. 3. 2. 6. Analyse statistique

Pour mettre en évidence une différence significative de VO₂ maximale de 5 ml/kg/min entre le groupe pneumonectomie et le groupe lobectomie à 6 mois, valeurs attendues 15 ±5 et 20±5 ml/kg/min respectivement, avec une puissance de 90%, et un risque alpha de 0.05, il était nécessaire d'inclure 18 sujets par groupe. Compte tenu du troisième groupe (bilobectomie) et pour tenir compte de l'inflation du risque alpha lié aux analyses multiples (évaluation à 3 jours et à 6 mois), nous avons augmenté ce nombre à 30 patients par groupe.

Le nombre de sujets nécessaires était donc évalué à 90 patients, 30 par type de chirurgie c.à.d 30 dans chaque groupe « lobectomie », « bilobectomie », et « pneumonectomie ». Nous prévoyons de stratifier par centre, soit 15 patients par type de chirurgie et par centre.

S'agissant encore d'un projet d'étude, nous ne détaillerons pas le plan d'analyse statistique. Le but est de comparer les données préopératoires à celles obtenues en postopératoires pour chaque groupe de patient (données appariées), puis de comparer les groupes de patients, par exemple lobectomie vs. pneumonectomie à 6 mois (données non appariées).

III. 3. 2. 7. Résultats attendus et perspectives de recherche

Nous pensons obtenir les résultats suivants. Les résections pulmonaires majeures altèrent la capacité à l'exercice en postopératoire. La réduction du lit vasculaire pulmonaire est responsable d'un HTP et d'une dysfonction VD se manifestant principalement à l'effort, de façon plus prononcée après pneumonectomie ou bilobectomie qu'après lobectomie. De cette manière, nous espérons mettre en évidence un « effet dose ».

Ce protocole de recherche clinique, qui met l'accent sur la capacité à l'exercice, pourrait servir de cadre expérimental pour une seconde étude de recherche clinique, évaluant les effets d'un traitement vasodilatateur pulmonaire sur le développement de l'HTP et le remodelage du VD après résection pulmonaire majeure, avec comme objectif principal d'améliorer la tolérance cardio-respiratoire à l'effort à 6 mois.

IV. RESULTATS

PLAN

IV. 1. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE I DESCRIPTIVE.....	117
IV. 1. 1. ETUDE E1 : Hypertension pulmonaire après pneumonectomie .	117
IV. 1. 1. 1. Introduction.....	117
IV. 1. 1. 2. Soumission aux revues scientifiques	117
IV. 1. 1. 3. Présentation dans des Congrès Nationaux ou Internationaux.....	118
IV. 1. 1. 4. Publication	118
IV. 1. 1. 5. « <i>Supplementary Appendix</i> » publié dans EJCTS.....	127
IV. 1. 1. 6. Résultats supplémentaires absents du « <i>Supplementary Appendix</i> »	134
IV. 1. 1. 7. Conclusion sur l'étude E1	138
IV. 1. 2. ETUDE E2 : Influence de la mutation BMPR2	139
IV. 2. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE II THERAPEUTIQUE.....	141
IV. 2. 1. ETUDE T1 : Pré-conditionnement pulmonaire.....	141
IV. 2. 2. ETUDE T2 : Prévention par un inhibiteur sélectif du <i>PDGF-Béta receptor</i>.....	143
IV. 3. RECHERCHE CLINIQUE	149
IV. 3. 1. ETUDE C1 : « <i>RESECHO study</i>».....	149
IV. 3. 1. 1. Introduction.....	150
IV. 3. 1. 2. Study population	150
IV. 3. 1. 3. Postoperative alteration of the RVLW longitudinal strain	151
IV. 3. 1. 4. Incidence of RV dysfunction diagnosed by the other RV parameters.....	151
IV. 3. 1. 5. Evolution of the echocardiographic parameters over the study period.....	151
IV. 3. 1. 6. Evolution of the RV parameters in the “Altered” and “Preserved” RVLW strain groups	152
IV. 3. 1. 7. Correlation between the RVLW longitudinal strain and the other RV systolic parameters..	152
IV. 3. 1. 8. Postoperative complications	152
IV. 3. 1. 9. Preoperative risk factors for developing an “altered” RVLW strain after surgery.....	152
IV. 3. 1. 10. Conclusion	153

IV. 1. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE I DESCRIPTIVE

IV. 1. 1. ETUDE E1 : HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE : UN MODELE PRECLINIQUE CHEZ LE RAT, ASSOCIE A UN MODELE DE «*SHEAR STRESS*» SUR CELLULE ENDOTHELIALE PULMONAIRE HUMAINE.

IV. 1. 1. 1. Introduction

Dans la littérature, l'hypertension pulmonaire et le remodelage cardiaque droit sont bien décrits après chirurgie de résection pulmonaire majeure. Seulement, la physiopathologie demeurerait encore mal comprise. De plus, la classification OMS de l'hypertension pulmonaire ne mentionnait pas clairement cette pathologie. Les modèles expérimentaux existants présentaient de nombreuses limites. Soit la chirurgie était réalisée chez de petites cohortes de gros animaux, avec des résultats peu reproductibles d'une équipe à l'autre. Soit la pneumonectomie était réalisée chez le rongeur, mais en association avec un second agent pathogène, comme la monocrotaline ou l'hypoxie. Ce type d'hypertension pulmonaire réactionnelle à une agression multiple (« *multiple-hit models* ») nous paraissait peu pertinent pour une étude qui se voulait translationnelle dans le domaine de la chirurgie thoracique. A ce modèle expérimental animal, nous avons associé des expériences d'étirement cyclique pathologique sur cellules endothéliales pulmonaires et cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires humaines. Dans cette partie, nous avons étudié les effets du *shear stress* sur la fonction paracrine des cellules endothéliales pulmonaires, sur l'expression génique des facteurs de croissance, et sur la croissance des cellules musculaires lisses.

IV. 1. 1. 2. Soumission aux revues scientifiques

2018/04 : Soumission au *Journal of American College of Cardiology* : refusé.

2018/05 : Soumission au *Journal of Experimental Medicine* : refusé.

2018/06 : Soumission au *European Respiratory Journal* : *reviewing* et refusé.

2018/07 : Soumission à *Thorax* : refusé.

2018/09 : Soumission au *Journal of Heart and Lung Transplantation* : *reviewing* et refusé.

2018/12 : Soumission à *Chest* : refusé.

2019/01 : Soumission à *Annals of Surgery* : refusé.

2019/02 : Soumission au *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* : *reviewing* et refusé.

2019/10 : Soumission à *Anesthesiology* : *reviewing (major revisions)*, version révisée refusée.

2020/02 : Soumission à *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* : *reviewing (major revisions)* et accepté après la première version révisée.

IV. 1. 1. 3. Présentation dans des Congrès Nationaux ou Internationaux

2018-09-21 : 33rd Annual EACTA (*European Association of Cardio-Thoracic Anesthesiology*) Congress 2018 in Collaboration with ACTACC, Manchester (U.K.), 19th -21st September 2018. 1st Prize in the Category « Best Oral Presentation » – *Pulmonary hypertension and heart disease after pneumonectomy: the central role of endothelial cells* – Pierre Sentenac (PhyMedExp laboratory, University of Montpellier, France)



Photo de la remise du prix. À gauche de l'image: Fabio Guarracino, président de l'EACTA à droite : Patrick Wouters, vice-président de l'EACTA. Au centre Pierre Sentenac.

2018-09-28 : Congrès Annuel de la Société Française d'Anesthésie Réanimation (SFAR), 27 au 29 Septembre 2018, Palais des Congrès, Paris (France). Présentation d'un E-Poster.

2018-10-23 : 31st Annual ESICM (*European Society of Intensive Care Medicine*) Congress, on 20th - 24th October 2018, at the Palais des Congrès, Paris (France). Communication orale.

IV. 1. 1. 4. Publication

Le manuscrit a été définitivement accepté le 1^{er} Juillet 2020 dans la Revue « *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* ».

Pierre Sentenac, Gianluca Samarani, Patrice Bideaux, Pierre Sicard, Benjamin Bourdois, Sylvain Richard, Pascal H Colson, Saadia Eddahibi, Pulmonary hypertension after pneumonectomy: a preclinical model in rats and human pulmonary endothelial cells, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Published: 25 September 2020, ezaa277, <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa277>

Cite this article as: Sentenac P, Samarani G, Bideaux P, Sicard P, Bourdois B, Richard S *et al.* Pulmonary hypertension after pneumonectomy: a preclinical model in rats and human pulmonary endothelial cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 2020; doi:10.1093/ejcts/ezaa277.

Pulmonary hypertension after pneumonectomy: a preclinical model in rats and human pulmonary endothelial cells

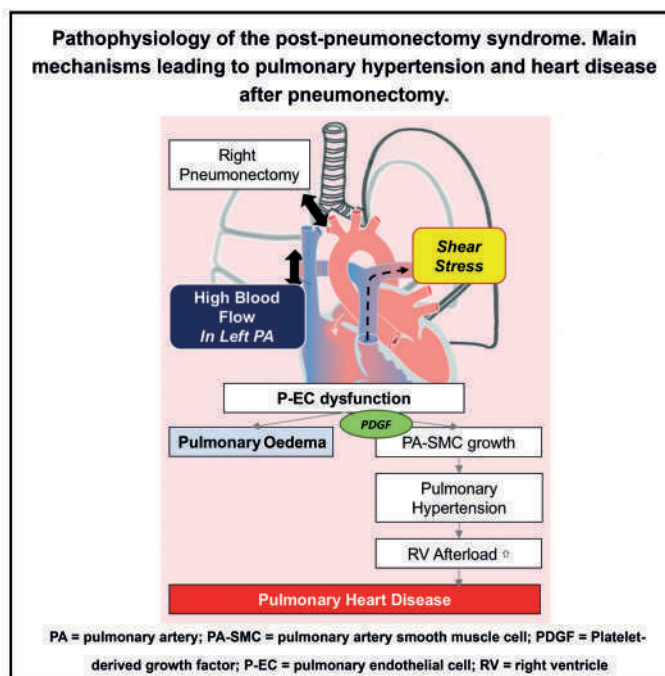
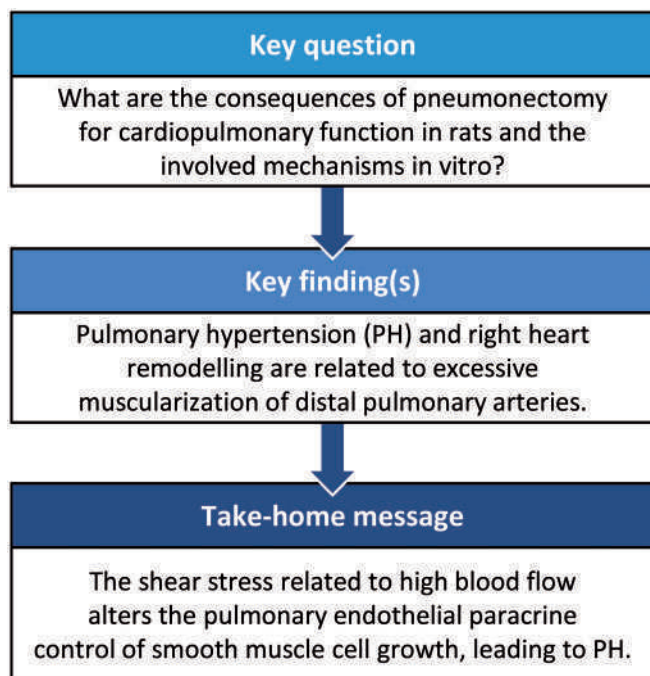
Pierre Sentenac ^{a,b,*}, Gianluca Samarani^{a,b}, Patrice Bideaux^a, Pierre Sicard ^a, Benjamin Bourdois^{a,b}, Sylvain Richard^a, Pascal H. Colson ^b and Saadia Eddahibi^{a,†}

^aPhyMedExp, University of Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France

^bDepartment of Anaesthesiology and Critical Care Medicine, Heart and Lung Center, Arnaud de Villeneuve Teaching Hospital, Montpellier University School of Medicine, Montpellier, France

* Corresponding author. Département d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Pôle Coeur-Poumons, 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 05, France. Tel: +33-788-014-609; e-mail: dr.sentenac@gmail.com (P. Sentenac).

Received 1 March 2020; received in revised form 16 June 2020; accepted 1 July 2020



Abstract

OBJECTIVES: Pulmonary hypertension and heart disease contribute to the high morbidity rate following pneumonectomy (PN). The pathophysiology is still poorly understood. The objective was to investigate the consequences of PN on cardiopulmonary function in rats and to explore *in vitro* the involved mechanisms.

METHODS: Sixty Sprague-Dawley male rats randomly underwent either a right PN (PN group) or sham surgery. Ten rats per group were sacrificed on postoperative days 3, 7 and 28. Cardiopulmonary alterations were investigated by echocardiographic, haemodynamic and histological analyses. *In vitro*, the shear stress was reproduced using a Flexcell TensionTM cyclic stretch on cultured human pulmonary

[†]Deceased.

Presented at the 33rd Annual European Association of Cardiothoracic Anaesthesiology (EACTA) Congress 2018 in Collaboration with ACTACC, Manchester, UK, 19–21 September 2018, first prize in the category 'best oral presentation'.

endothelial cells (P-ECs) to investigate the impact on pulmonary artery smooth muscle cell (PA-SMC) growth. Data are expressed as mean \pm SD.

RESULTS: Mean pulmonary arterial pressure gradually increased in the PN group to reach 35 ± 7 mmHg on postoperative day 28 vs 18 ± 4 in sham ($P = 0.001$), likewise the proportion of muscularized distal pulmonary arteries, $83 \pm 1\%$ vs $5 \pm 1\%$, respectively ($P < 0.001$), related to *in situ* PA-SMC proliferation. The right ventricle area and lateral wall thickness were doubled in the PN group on postoperative day 28. The left ventricle ejection fraction decreased on postoperative days 7 and 28 while the right ventricle function was maintained. *In vitro*, the human PA-SMC growth was significantly greater when seeded with stretched vs non-stretched P-EC media, highlighting the role of shear stress on the P-EC paracrine function.

CONCLUSIONS: Right PN led to pulmonary hypertension and proportional right heart remodelling in rats. The shear stress related to high blood flow alters the pulmonary endothelial paracrine control of SMC growth.

Keywords: Pneumonectomy • Pulmonary hypertension • Pulmonary heart disease • Models • Animal • Endothelial cells • Growth factors

ABBREVIATIONS

ANOVA	Analysis of variance
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
LV	Left ventricle
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
P-EC(s)	Pulmonary endothelial cell(s)
PA-SMC(s)	Pulmonary artery smooth muscle cell(s)
PAP	Pulmonary arterial pressure
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	Pulmonary hypertension
PN	Pneumonectomy
RV	Right ventricle
WHO	World Health Organization

INTRODUCTION

Surgery serves a major role in lung cancer management, but large pulmonary resections are still associated with elevated postoperative morbidity rate [1]. Right pneumonectomy (PN) is associated with the poorest outcome [2, 3]. Pulmonary hypertension (PH) is a frequent complication following PN [4] that could contribute to decrease the postoperative quality of life [2] and survival [4, 5]. PH could lead to heart dysfunction [6, 7], supraventricular tachyarrhythmia [7, 8] and pulmonary oedema [9]. Although described in literature, the pathophysiology of PH in the context of PN is unique, poorly investigated and not explicitly mentioned in the 2019 updated WHO classification [10].

Despite several studies in the field of pulmonary resection surgeries, the results are discordant and have some limitations. Most studies were performed in small cohorts of large animals [11–13]. In the few studies carried out in rats, PN was frequently combined with monocrotaline [14, 15], or another additional hit [16], in multiple-hit models, which is less directly relevant to the scope of thoracic surgery.

Increased blood flow in the remaining pulmonary arteries is suspected to play a key role in the development of PH after PN. The role of disturbed blood flow is well recognized in other PH diseases. Aorto-pulmonary or aorto-caval shunt surgeries, well-known models of congenital heart disease [17], expose the pulmonary vascular bed to excessive blood flow. This appears to activate several signalling pathways that promote pulmonary

arteriolar vasoconstriction, inflammation and thickening, leading to PH.

After PN, halving the pulmonary vascular bed automatically leads to high blood flow in the remaining lung. The shear stress represents the mechanical forces resulting from the flow rate and velocity of the surrounding fluid across the surface of vessels. It is clearly established that the pulmonary endothelial cells (P-ECs) convert mechanical signals into biochemical signals affecting pulmonary vascular tone, permeability and remodelling [17], in human and experimental PH [18]. Our hypothesis is that the P-EC function is altered by increased blood flow in the contralateral lung after PN, leading to pulmonary artery smooth muscle cell (PA-SMC) growth and PH development.

The aim of the present study was to comprehensively investigate the consequences of right PN on pulmonary circulation and heart function *in vivo* in a rat model. Primary outcome was invasive pulmonary arterial pressure (PAP). Pulmonary artery muscularization and remodelling were described. Heart function and pulmonary oedema were also studied. As PN is associated with increased blood flow in the remaining lung, we sought to determine *in vitro* the effects of a pathological cyclic stretch exposure on the phenotype of cultured human P-ECs and PA-SMCs.

MATERIALS AND METHODS

In vivo study

All experiments were conducted in the PhyMedExp laboratory, according to the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals', also in compliance with the 'NC3Rs ARRIVE' guidelines. The protocol was approved by an Ethics Committee (No 3775) and authorized by the French Ministry of Education, Research and Innovation (No 2016012514021222).

Sixty adult male Sprague-Dawley rats aged 11 weeks (390 g) were randomized into 2 groups to receive either a right PN (PN group) or a right thoracotomy without pulmonary resection (sham group). The anaesthetic protocol is detailed in the [Supplementary Material](#), Methods. Ten rats per group were sacrificed on postoperative days 3, 7 and 28 (D3, D7 and D28, respectively).

A standardized transthoracic echocardiography was performed under spontaneous ventilation in isoflurane-anaesthetized rats by the same technician, blinded to the surgery, using a high-resolution small-animal ultrasound machine (Vevo 2100TM, FUJIFILM VisualSonics®, Toronto, ON, Canada) at baseline, D3, D7 and D28 if appropriate ([Supplementary Material](#), Methods).

At the end of follow-up, mean PAP, right ventricle systolic pressure and systemic arterial pressure were measured by closed-chest catheterization as described previously [19], in ventilated rats. Data acquisition used LabChart7™ (ADInstruments®, Sydney, NSW, Australia).

At the end of catheterization, a complementary lethal dose of barbiturate was administered. Then, the heart was dissected and weighed for the calculation of the right ventricle(RV) hypertrophy index {Fulton index = RV/[left ventricle(LV) + septum] weight} and ventricle-normalized weight [RV or (LV + septum) weight/animal weight]. Then, the RV was fixed in a formalin buffer. Pulmonary oedema was assessed using the wet/dry ratio.

In situ study

The left lung was fixed in the distended state within intratracheal infusion of a formalin buffer. After paraffin embedding, the 5- μ m-thick lung and RV sections were mounted on Superfrost™ slides for morphometric and immunohistological analyses. All stainings were analysed with an epifluorescence microscope and NIS-Elements™ software (Nikon® 80i, Tokyo, Japan).

The evaluation of distal artery muscularization was performed as described previously [19]. Briefly, in each rat, 60 intra-acinar arteries (100 μ m on average) were examined and categorized as non-muscularized, partially muscularized or muscularized. The relative wall thickness index was also calculated [(external diameter - internal diameter)/external diameter, expressed in %].

PA-SMC proliferation was assessed using a proliferating cell nuclear antigen immunostaining of lung sections from rats on D28, as described previously [20]. The inflammatory process was estimated using the CD68 immunostaining. Nuclei were stained with diamidino-2-phenylindole.

Masson's trichrome staining was performed on RV sections, and the RV fibrosis was quantified (RV fibrosis/RV area).

In vitro study

To investigate the cellular changes in response to increased blood flow, human-cultured P-ECs and PA-SMCs from 10 patients were prepared as previously described [18, 20]. We used lung specimens previously obtained during resection procedures for patients with localized lung cancer, free from PH or COPD, collected at a distance from tumour foci (see patient characteristics in [Supplementary Material, Table S1](#)). Written informed consent was obtained from all patients prior to experimentation. The protocol was previously approved by the local ethics committee (ID RCB 2008-A00485-50).

Seeded P-ECs (10^5 cells per well) were serum-starved and exposed over 24 h to high magnitude cyclic stretch elongation, 18% (pathological strain) or 5% (physiological strain) at 1 Hz in an FX-5000 Tension Plus™ system (Flexcell®, Burlington, VT, USA), as described by Birukov *et al.* [21]. Then, the P-EC supernatant was collected and added to seeded PA-SMCs (10^5 cells per well), exposed or not to pathological cyclic stretch for 24 h more ([Supplementary Material, Fig. S1](#)). PA-SMC proliferation was also assessed under control media, 0% and 5% foetal calf serum (minimal and maximal proliferation capacity, respectively). At the end of the exposure period, the cell proliferation was measured using tetrazolium salt (MTT) assay. The experiments were performed on 10 samples, and each sample was analysed in triplicate.

A molecular characterization of messenger ribonucleic acid (mRNA) expressed by P-ECs was performed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction as described previously [18] ([Supplementary Material, Methods](#)).

Statistical analysis

The primary outcome was mean PAP. Six rats per group were necessary to highlight a difference of mean PAP of 10 mmHg between the sham and PN groups on D28 (expected values 25 and 35 mmHg, respectively, SD = 5 mmHg), with a statistical power of 0.90 and a two-tailed alpha risk of 0.05. The number of rats was increased to 10 rats per group per time point to minimize the risk of type II error. Statistical analysis used Prism 8™ (GraphPad® software, La Jolla, CA, USA). Outliers were analysed, and no action was necessary. All data are expressed as mean \pm SD (with median and 'min to max' in box plots). The normality of distribution was assessed using Shapiro-Wilk tests, and heteroscedasticity was assessed using Spearman's test. Two-way ANOVA tests were performed, the 2 factors were the group and time point. *Post hoc* comparisons were performed with the correction of Sidak for multiple comparisons. All *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

In vivo study

The perioperative mortality was <10% in the PN group ($n=3$), all with a haemothorax developed within the first 24 h. Ten rats per group per time point were finally evaluated. There were no missing data among survivors.

Compared to the sham group, the mean PAP was increased on D3, D7 and D28 in the PN group, respectively, 29 ± 8 vs 18 ± 2 ($P=0.033$), 33 ± 4 vs 19 ± 2 ($P=0.003$) and 35 ± 7 vs 18 ± 4 mmHg ($P=0.001$). The right ventricle systolic pressure coherently showed the same evolution (Fig. 1). No significant changes were detected in systemic arterial pressure, right atrium pressure and heart rate.

The RV dilated at the expense of the LV in the PN group, so that the RV/LV ratio was >1 on D28 (1.2 ± 0.3 vs 0.5 ± 0.2 in the sham group, $P<0.001$) (Fig. 2A) and a paradoxical septum motion occurred (Videos 1 and 2). The RV lateral wall thickness approximately doubled in the PN group on D28 compared to the sham group, 1.8 ± 0.3 vs 0.9 ± 0.2 mm ($P<0.001$), close to the thickness of the LV anterior wall (Fig. 2B). The RV fractional area change was preserved in both groups, while the LV ejection fraction decreased in the PN group on D7 and D28, respectively, 66 ± 13 vs $74 \pm 7\%$ ($P=0.025$) and 65 ± 7 vs $78 \pm 6\%$ ($P=0.007$) (Fig. 2C). Besides, the RV outflow tract cardiac output remained comparable between groups over time ([Supplementary Material, Fig. S2](#)).

In the PN group, the RV hypertrophy was confirmed by both the RV hypertrophy index and RV-normalized weight (Fig. 3). The LV-normalized weight remained comparable in both groups. Animal weight was comparable in both groups on D28 ([Supplementary Material, Table S2](#)).

The lung wet/dry ratio increased on D3 from 4.9 ± 0.2 in the sham group to 5.5 ± 0.4 in the PN group ($P<0.001$). This difference was no longer observed on D7 and D28 (Fig. 3C).

In situ study

Compared to the sham group, the proportion of muscularized distal pulmonary arteries was increased in the PN group on D7 and D28, respectively $67 \pm 2\%$ vs $5 \pm 1\%$ ($P < 0.001$) and $83 \pm 2\%$ vs

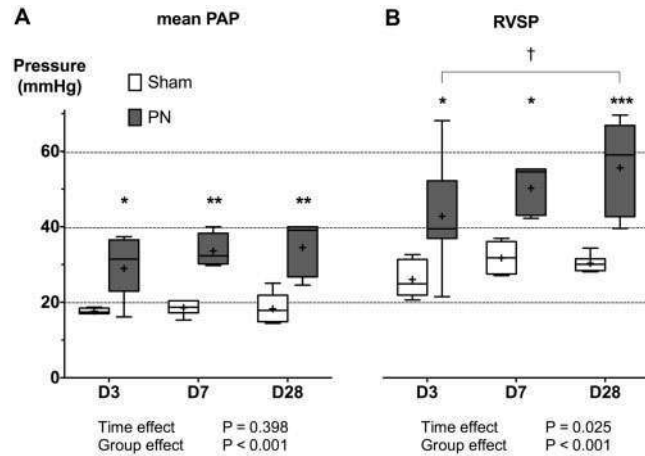


Figure 1: Haemodynamic assessment of pulmonary hypertension. Mean PAP (A) and RVSP (B) measured by right heart catheterization in the sham and PN groups on D3, D7 and D28 (mean \pm SD, median, min to max). Two-way ANOVA tests with Sidak correction: adjusted P -values (*) < 0.05 , (**) < 0.01 and (***) < 0.001 for comparing sham vs PN at each time point; adjusted P -values (†) < 0.05 , (††) < 0.01 and (†††) < 0.001 for comparing time effect in each group. D3: postoperative day 3; D7: postoperative day 7; D28: postoperative day 28; PAP: pulmonary arterial pressure; PN: pneumonectomy; RVSP: right ventricle systolic pressure.

$5 \pm 1\%$ ($P < 0.001$) (Fig. 4). In addition, the relative wall thickness index of muscularized arteries increased markedly in the PN group on D7 and D28 (Fig. 5A). Some pseudo-occluded distal pulmonary arteries were detected in the PN group on D28 (Fig. 5B).

In line with the muscularization, the proliferating cell nuclear antigen staining showed an abnormal *in situ* PA-SMC proliferation in the PN group (Fig. 6A), and more macrophage infiltrate at the alveolar and perivascular levels (Fig. 6B). The fibrosis deposits were more important in the RV sections of PN rats on D7 and D28 (Supplementary Material, Fig. S3).

In vitro study

The human PA-SMC proliferation was significantly greater when incubated with stretched P-EC media than non-stretched P-EC media (Fig. 7). However, the exposure of cultured human PA-SMCs to a pathological stretch did not affect PA-SMC growth, highlighting that human P-ECs were more reactive to the magnitude of cyclic stretch than PA-SMCs.

As compared to mRNA level in non-stretched P-ECs, the platelet-derived growth factor (PDGF) mRNA was twice as high as in stretched P-ECs, while basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor remained unchanged. Concerning the explored vascular tone pathways, the endothelial nitric oxide synthase seemed to be overexpressed whereas the endothelin-1 did not change (Supplementary Material, Fig. S4).

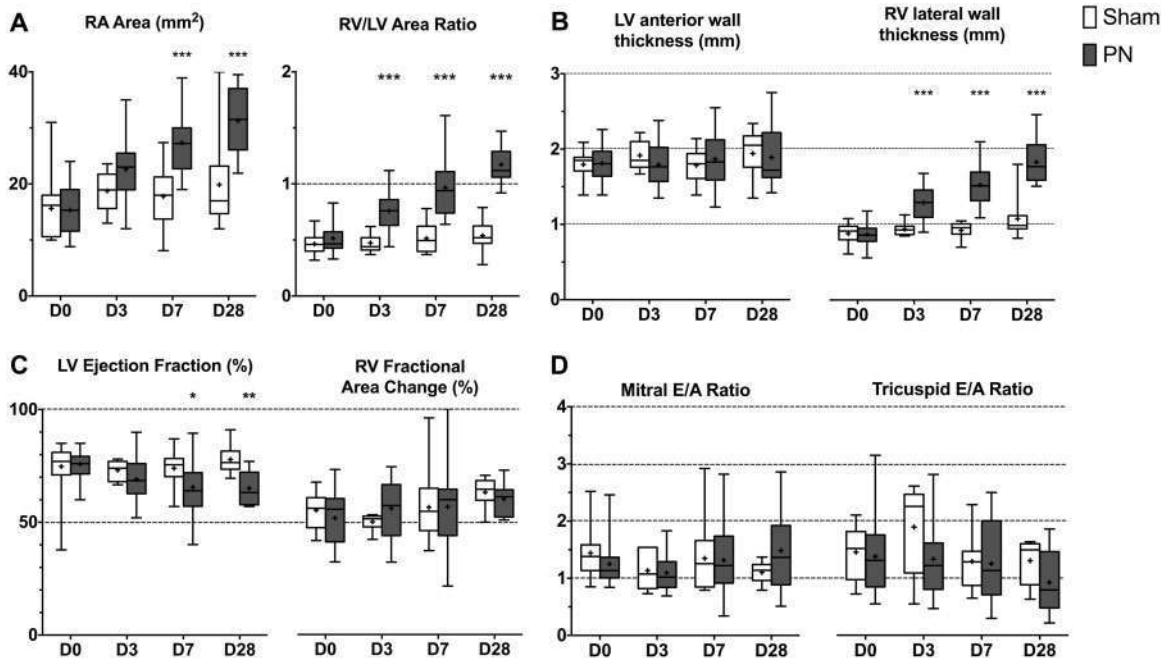
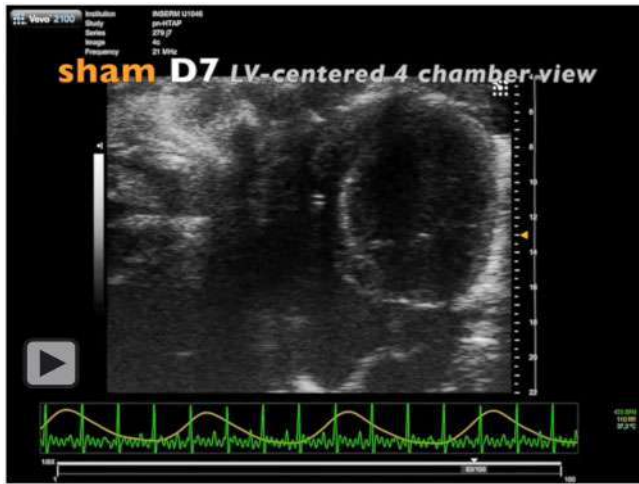


Figure 2: Echocardiographic follow-up. Echocardiographic measurements in the sham and PN groups on D0, D3, D7 and D28 (mean \pm SD, median, min to max): (A) RA area and RV/LV area ratio measured in the apical four-chamber view; (B) end-diastolic LV anterior wall thickness and RV lateral wall thickness measured in short-axis view; (C) LV ejection fraction and RV fractional area change; (D) mitral and tricuspid E/A wave velocity ratios measured in four-chamber view. Two-way ANOVA tests with Sidak correction: adjusted P -values (*) < 0.05 , (**) < 0.01 and (***) < 0.001 for comparing sham vs PN at each time point. D0, baseline; D3: postoperative day 3; D7: postoperative day 7; D28: postoperative day 28; LV: left ventricle; PN: pneumonectomy; RA: right atrium; RV: right ventricle.



Video 1: Transthoracic echocardiography in a rat from the sham group on postoperative day 7 (four-chamber view, short-axis view and pulmonary artery-centred short-axis view). Acquired with Vevo 2100™ (FUJIFILM VisualSonics®).



Video 2: Transthoracic echocardiography in rats from the pneumonectomy (PN) group on postoperative days 7 and 28 (four-chamber view, short-axis view and pulmonary artery-centred short-axis view) showing right ventricle dilatation, hypertrophy of the RV lateral wall and a paradoxical septum motion in the PN group. Acquired with Vevo 2100™ (FUJIFILM VisualSonics®).

DISCUSSION

Although lobar and sublobar resections are the treatment of choice for lung cancer, which can better preserve the lung function and minimize the impact on the cardiopulmonary circulation, PN still represents 10–15% of lung resection surgeries. The effects of PN on right heart function have been observed in the clinical setting for many years, contributing to the poor prognosis observed after this type of surgery, associated with high morbidity and an in-hospital mortality of 8% [1]. Most of the previous studies used left PN or relied on multiple-hit methods and agents like monocrotaline [11–16]. It was of major importance to develop a small-animal model of PH after right PN only, which is directly relevant to the scope of thoracic surgery and perioperative medicine.

In our model, a moderate and sustained PH occurred after PN and was associated with a proportional and selective right heart remodelling. Kocatürk *et al.* [13] found almost the same level of systolic PAP 1 month after PN in dogs, with right heart dilatation. Other authors reported a transient PH following left PN in pigs [11], as PAP was normalized 72 h after surgery. In human studies, a gradual increase in PAP is described following PN [3], more severe after right-side resection than left-side resection and associated with progressive RV dilatation [3, 6, 7].

Probably, PH and RV remodelling may depend on both the magnitude of pulmonary resection and the adaptive lung growth capability, which depend on sex and age and are species specific [22, 23]. If there is a resected-volume threshold below which no complications occur, the right-sided PN (~63% of lung mass in rats) appears to be above it. Le Cras *et al.* [23] highlighted an RV hypertrophy after right PN but no RV alteration after right bilobectomy in rats. The contralateral lung growth and neoangiogenesis after PN could be protective mechanisms by lowering the impact of high blood flow. Future research could study the impact of targeted anti-angiogenic therapies such as anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) used in lung cancer on lung growth capabilities after PN.

The RV systolic function was preserved in our model. Previous human studies reported contrasting results. Authors noted that RV ejection fraction was decreased by ~20% within 3 days after PN, without changes in the cardiac output at rest [7, 24]. Regarding the LV function impairment, a plausible explanation is

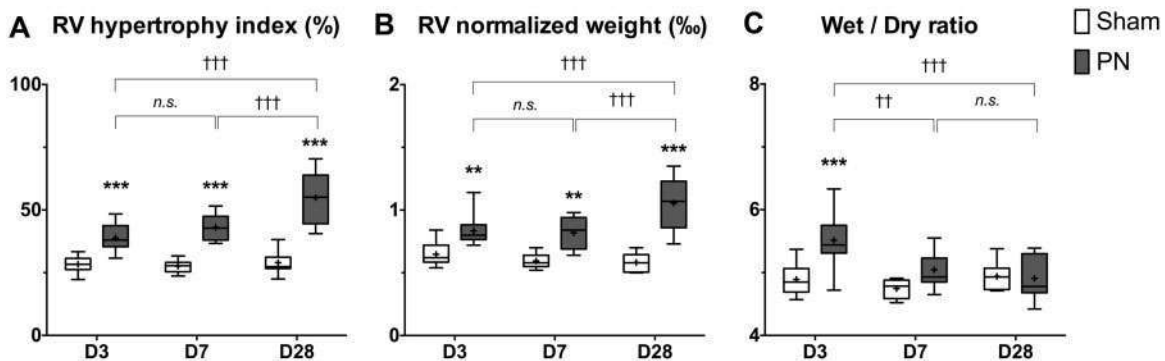


Figure 3: Gravimetric measurements. RV hypertrophy assessed by the right ventricle hypertrophy index [Fulton index = right ventricle/(left ventricle + septum) weight] (A) and the RV-normalized weight (RV weight/animal weight) (B) and pulmonary oedema estimated by the lung wet/dry ratio (C) in the sham and PN groups on D3, D7 and D28 (mean ± SD, median, min to max). Two-way ANOVA tests with Sidak correction: adjusted *P*-values (*) <0.05, (**) <0.01 and (***) <0.001 for comparing sham vs PN at each time point; adjusted *P*-values (†) <0.05, (††) <0.01 and (†††) <0.001 for comparing time effect in each group. D3: postoperative day 3; D7: postoperative day 7; D28: postoperative day 28; RV: right ventricle; PN: pneumonectomy.

that the RV dilatation probably altered the ventricular interdependence leading to LV ejection fraction decrease. Given that ventricles share the same short-termed inextensible pericardium, the RV volume or pressure overloading affects LV function, which is enhanced by a thickened RV-free wall. The displacement of the interventricular septum with paradoxical movement attests that the RV afterload dramatically increased.

In the literature, there is evidence supporting a cardiorespiratory functional deterioration for exercise tolerance, in both the early [24] and late postoperative periods [2]. Authors found deteriorated RV function, elevated PAP and elevated right atrium pressure only during exercise, 3 days after pulmonary resection [24]. Moreover, Miyazawa et al. [2] remarkably demonstrated that cardiac output adjustment to exercise was progressively impaired

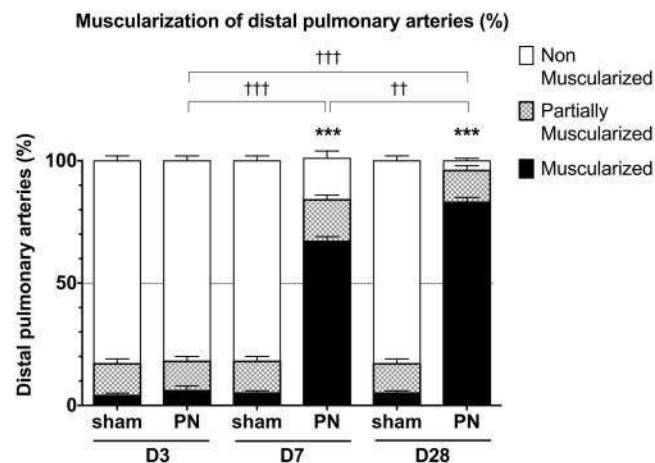


Figure 4: Muscularization of distal pulmonary arteries. Distribution of non-muscularized, partially muscularized and muscularized distal pulmonary arteries in the sham and PN groups on D3, D7 and D28 (percentage \pm SD). Two-way ANOVA tests with Sidak correction to compare the proportion of muscularized vessels: adjusted *P*-values (*) <0.05, (**) <0.01 and (***) <0.001 for comparing sham vs PN at each time point; adjusted *P*-values (†) <0.05, (††) <0.01 and (†††) <0.001 for comparing time effect in each group. D3: postoperative day 3; D7: postoperative day 7; D28: postoperative day 28; PN: pneumonectomy.

over time and that PAP and vascular resistance increased with increasing exercise load.

In line with the haemodynamic parameters, PH was related to the high muscularization rate of distal pulmonary arteries and a dramatic increase in wall thickness. It is therefore undeniable that PH is a progressive process. Le Cras et al. [23] found almost the same rates of muscularized arteries 3 weeks after right PN. Indeed, it is unlikely that PH will regress without a haemodynamic unloading intervention [25]. The pulmonary vascular remodeling was associated with an *in situ* PA-SMC growth and lung inflammation described as a modest infiltration of macrophages, frequently linked to PH.

Our data suggest an early and transitory pulmonary oedema, as the wet/dry ratio was normalized at late stages, which is in line with previous studies in large animals [11, 12]. This is also concordant with other models of increased blood flow, such as aorto-pulmonary shunt, in which pulmonary oedema could occur in case of profound volume overload. The pathophysiological mechanisms of post-PN pulmonary oedema result from an increased permeability of the alveolar capillary barrier, linked to endothelial cell junction alterations, and increased blood flow [26]. Nonetheless, the role of endothelial cells is not limited to permeability regulation.

We recently showed in idiopathic pulmonary arterial hypertension that PA-SMCs have no self-sufficient proliferation capacity [20], highlighting that PA-SMC growth should be regulated by other triggers. The *in vitro* data provide evidence that P-ECs, in response to shear stress, play a key role in the proliferation of PA-SMC in a paracrine fashion. Shear stress probably increased the levels of PDGF-B transcripts by direct activation of shear stress responsive element located on PDGF-B promoter region [27].

Limitations

Adding groups of animals treated by lobectomy and left PN could show a dose-effect relationship, which would have strengthened our observation. With the lack of sensors, it remains uncertain if the level of shear stress reproduced *in vitro* is identical to the one following PN in rats. A model of isolated distal

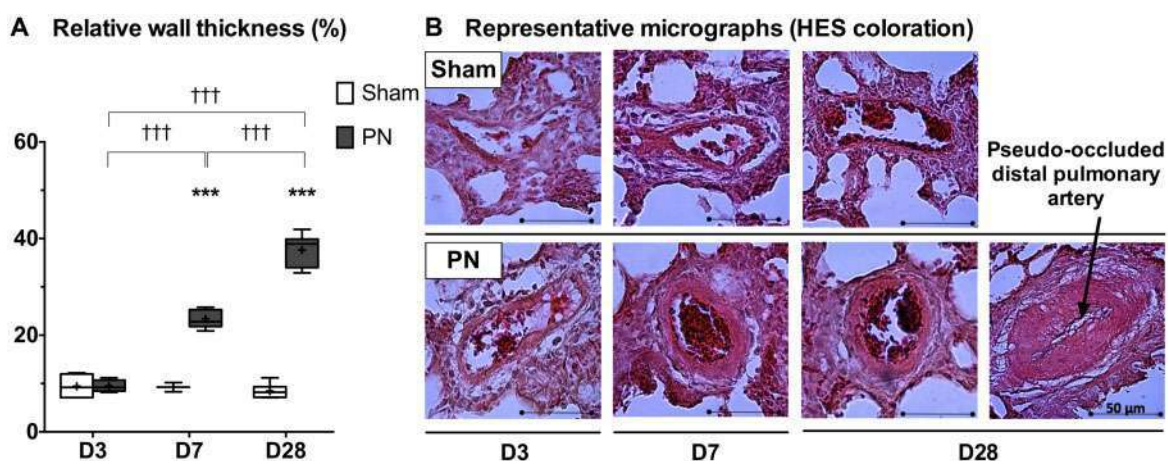


Figure 5: Relative wall thickness of distal pulmonary arteries. Relative wall thickness of distal pulmonary arteries in the sham and PN groups on D3, D7 and D28 (mean \pm SD) (A). Representative micrographs from HES-stained lung sections of distal pulmonary arteries from sham and PN rats on D3, D7 and D28 (scale bar indicates 50 μ m) (B). Two-way ANOVA tests with Sidak correction: adjusted *P*-values (*) <0.05, (**) <0.01 and (***) <0.001 for comparing sham vs PN at each time point; adjusted *P*-values (†) <0.05, (††) <0.01 and (†††) <0.001 for comparing time effect in each group. D3: postoperative day 3; D7: postoperative day 7; D28: postoperative day 28; HES: haematoxylin-eosin-saffron; PN: pneumonectomy.

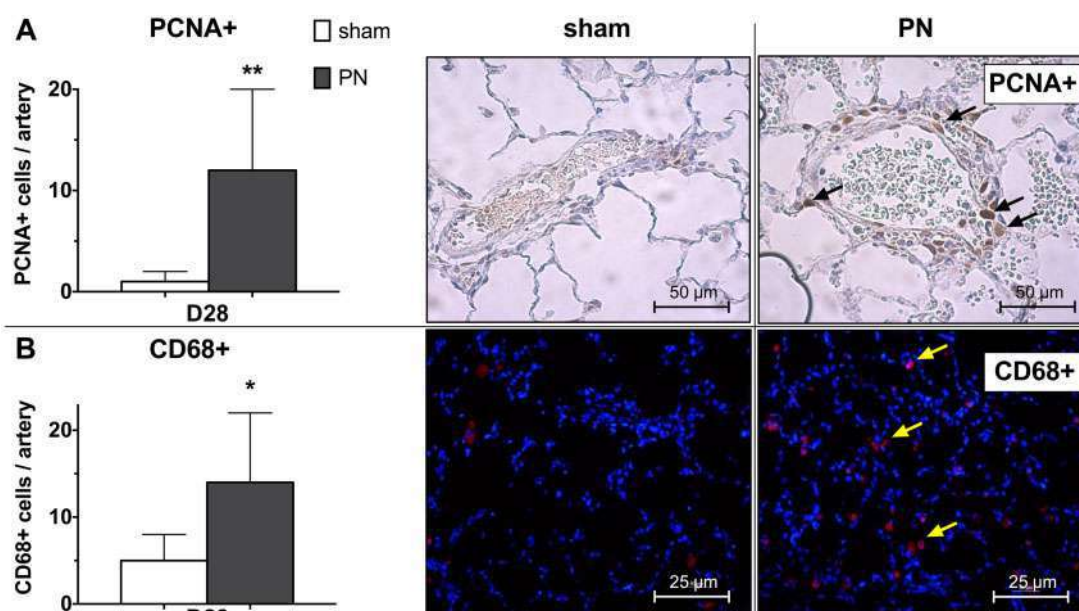


Figure 6: *In situ* PA-SMC proliferation and macrophage infiltrate. Quantification of PA-SMC proliferation (**A**) and macrophage infiltrate (**B**) assessed by PCNA and CD68 immunolabeling, respectively, in the sham and PN groups on D28 (mean \pm SD). Representative micrographs showing PCNA+ cells in brown (black arrows, scale bar indicates 50 μ m) and CD68+ cells in red (yellow arrows, scale bar indicates 25 μ m) in lung sections from rats in the sham and PN groups on D28. Unpaired *t*-tests *P*-values (*) <0.05 and (**) <0.01 for comparing sham vs PN. D28: postoperative day 28; PA-SMC: pulmonary artery smooth muscle cell; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; PN: pneumonectomy.

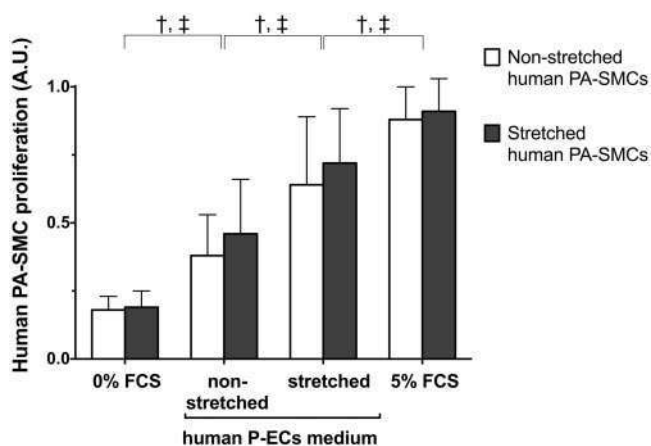


Figure 7: Impact of cyclic stretch on human PA-SMC proliferation. Quantification of human PA-SMC proliferation when exposed (stretched PA-SMCs, grey bars) or not (non-stretched PA-SMCs, white bars) to a 24-h pathological cyclic stretch stimulation, cultured in 4 media: in serum-free media derived from cultured P-ECs previously exposed (stretched P-ECs) or not (non-stretched P-ECs) to a pathological cyclic stretch over 24 h, and in control media (0% or 5% FCS, respectively, minimal and maximal proliferation) (A.U., mean \pm SD, 10 samples). Two-way ANOVA tests with Sidak correction. The 2 factors were the medium condition and stretched status of PA-SMCs. Adjusted *P*-value (*) <0.05 for comparing stretched vs non-stretched PA-SMC proliferation in each medium condition; (†) *P* <0.05 for comparing non-stretched PA-SMC proliferation in different media; (‡) *P* <0.05 for comparing stretched PA-SMC proliferation in different media. A.U.: arbitrary unit; FCS: foetal calf serum; PA-SMC: pulmonary artery smooth muscle cell; P-EC: pulmonary endothelial cell.

pulmonary artery exposed to different levels of flow rate or elongation would probably have helped to determine a cut-off. Furthermore, response to increased flow must depend on distension and recruitment capabilities of the remaining pulmonary

vascular bed, which could be variable from 1 patient to another. Finally, there could be other stressors non-flow related, such as mediastinal shift [28], extracellular matrix alterations, other cell types in the lung environment and other growth factors contributing to vascular remodelling after PN. Pulmonary vasodilators or anti-remodelling drugs, such as PDGF inhibitor, should lower both PAP and RV remodelling after PN.

CONCLUSIONS

Our study provides a comprehensive overview of the pathophysiology and kinetics of PH and heart remodelling over the first month after right PN in rats. Taken together, the results of the animal model in combination with the findings in human cells *in vitro* are an asset to better understand both the pathophysiological and cellular alterations in PH development following PN. Our model is a practical one to study new flow-related pathways and targeted drugs, such as growth factor inhibitors, which is of translational value in patients with flow-induced PH, such as patients with congenital cardiac shunt or patients undergoing large pulmonary resection surgeries.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available at *EJCTS* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the small-animal imaging platform of Montpellier (IPAM, Imagerie du Petit Animal de Montpellier,

INSERM U1046, Montpellier, France) for giving us access to the small-animal high-resolution echocardiography; the Department of Thoracic Surgery of the Marie-Lannelongue Hospital (Département de Chirurgie Thoracique, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France) and the French National Reference Center for Pulmonary Vascular Diseases (Centre National de Référence des maladies vasculaires pulmonaires, Le Kremlin-Bicêtre, France) for providing the lung specimens and human cells; Jean-Philippe Berthet (Department of Thoracic Surgery, Pasteur Hospital, Nice, France), Joanna Arthur-Ataam and Azzouz Charrabi (PhyMedExp Laboratory, Montpellier, France) for their help and support in experiments; and Claire Duflos (Biostatistics Department, Montpellier University Hospital, Montpellier, France) for her help in statistical analysis and interpretation.

Funding

Support for this study was received solely from institutional and/or departmental sources. There are no sponsors, no grants and no relationships with industry.

Conflict of interest: none declared.

Author contributions

Pierre Sentenac: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Software; Writing—original draft; Writing—review & editing. **Gianluca Samarani:** Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Supervision; Validation; Writing—review & editing. **Patrice Bideaux:** Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Writing—review & editing. **Pierre Sicard:** Investigation; Methodology; Resources; Software; Validation; Writing—review & editing. **Benjamin Bourdois:** Data curation; Formal analysis; Investigation; Software; Validation; Writing—review & editing. **Sylvain Richard:** Conceptualization; Formal analysis; Methodology; Project administration; Resources; Supervision; Validation; Writing—review & editing. **Pascal H. Colson:** Conceptualization; Formal analysis; Methodology; Project administration; Resources; Supervision; Validation; Writing—review & editing. **Saadia Eddahibi:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Writing—review & editing.

Reviewer information

European Journal of Cardio-Thoracic Surgery thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review process of this article.

REFERENCES

- Thomas PA, Berbis J, Baste J-M, Le Pimpec-Barthes F, Tronc F, Falcoz P-E *et al.* Pneumonectomy for lung cancer: contemporary national early morbidity and mortality outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015;149:73–82.
- Miyazawa M, Haniuda M, Nishimura H, Kubo K, Amano J. Long-term effects of pulmonary resection on cardiopulmonary function. *J Am Coll Surg* 1999;189:26–33.
- Foroulis CN, Kotoulas CS, Kakouros S, Evangelatos G, Chassapis C, Konstantinou M *et al.* Study on the late effect of pneumonectomy on right heart pressures using Doppler echocardiography. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:508–14.
- Potaris K, Athanasiou A, Konstantinou M, Zaglavira P, Theodoridis D, Syrigos KN. Pulmonary hypertension after pneumonectomy for lung cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2014;22:1072–9.
- Lugg ST, Agostini PJ, Tikka T, Kerr A, Adams K, Bishay E *et al.* Long-term impact of developing a postoperative pulmonary complication after lung surgery. *Thorax* 2016;71:171–6.
- Venuta F, Sciomer S, Andreotti C, Anile M, Giacomo TD, Rolla M *et al.* Long-term Doppler echocardiographic evaluation of the right heart after major lung resections. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:787–90.
- Kowalewski J, Brocki M, Dryjanski T, Kapron K, Barcikowski S. Right ventricular morphology and function after pulmonary resection. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:444–8.
- Amar D, Roistacher N, Burt M, Reinsel RA, Ginsberg RJ, Wilson RS. Clinical and echocardiographic correlates of symptomatic tachyarrhythmias after noncardiac thoracic surgery. *Chest* 1995;108:349–54.
- Turnage WS, Lunn JJ. Postpneumonectomy pulmonary edema: a retrospective analysis of associated variables. *Chest* 1993;103:1646–50.
- Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M *et al.* Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019;53:1801913.
- Berthet J-P, Attard O, Solovei L, Bourdin A, Serre I, Molinari N *et al.* Delayed pulmonary arterial hypertension in relation to pulmonary damage score after pneumonectomy under protective ventilation: experimental study. *Eur Surg Res* 2013;51:172–80.
- Kuzkov VV, Suborov EV, Kirov MY, Kuklin VN, Sobhkhz M, Johnsen S *et al.* Extravascular lung water after pneumonectomy and one-lung ventilation in sheep. *Crit Care Med* 2007;35:1550–9.
- Kocaturk M, Salci H, Yilmaz Z, Bayram AS, Koch J. Pre- and post-operative cardiac evaluation of dogs undergoing lobectomy and pneumonectomy. *J Vet Sci* 2010;11:257–64.
- White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL *et al.* Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L583–90.
- Dorfmueller P, Chaumais M-C, Giannakouli M, Durand-Gasselini I, Raymond N, Fadel E *et al.* Increased oxidative stress and severe arterial remodeling induced by permanent high-flow challenge in experimental pulmonary hypertension. *Respir Res* 2011;12:119.
- Happé CM, de Raaf MA, Rol N, Schalij I, Vonk-Noordegraaf A, Westerhof N *et al.* Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;310:L1088–1097.
- Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MAJ, Berger R. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;305:L1–14.
- Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Darteville P *et al.* Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 2006;113:1857–64.
- Eddahibi S, Raffestin B, Clozel M, Levame M, Adnot S. Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995;268:H828–35.
- Perros F, Sentenac P, Boulate D, Manaud G, Kotsimbos T, Lecerf F *et al.* Smooth muscle phenotype in idiopathic pulmonary hypertension: hyper-proliferative but not cancerous. *Int J Mol Sci* 2019;20:3575.
- Birukov KG, Jacobson JR, Flores AA, Ye SQ, Birukova AA, Verin AD *et al.* Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L785–97.
- Almeida FM, Saraiva-Romanholo BM, Vieira RP, Moriya HT, Ligeiro-de-Oliveira AP, Lopes FD *et al.* Compensatory lung growth after bilobectomy in emphysematous rats. *PLoS One* 2017;12:e0181819.
- Le Cras TD, Fernandez LG, Pastura PA, Laubach VE. Vascular growth and remodeling in compensatory lung growth following right lobectomy. *J Appl Physiol* 2005;98:1140–8.
- Okada M, Ota T, Okada M, Matsuda H, Okada K, Ishii N. Right ventricular dysfunction after major pulmonary resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:503–11.
- Mercier O, Sage E, de Perrot M, Tu L, Marcos E, Decante B *et al.* Regression of flow-induced pulmonary arterial vasculopathy after flow correction in piglets. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:1538–46.
- Lohser J, Slinger P. Lung injury after one-lung ventilation: a review of the pathophysiologic mechanisms affecting the ventilated and the collapsed lung. *Anesth Analg* 2015;121:302–18.
- Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Gimbrone MA. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4591–5.
- Stavroulias D, Ampollini L, Carbognani P, Rusca M. Post-pneumonectomy cavity: is there still a cavity?. *Ann Thorac Surg* 2010;89:312

IV. 1. 1. 5. « *Supplementary Appendix* » publié dans EJCTS

IV. 1. 1. 5. 1. « Supplementary Methods »

Description of the anaesthetic protocol

General anesthesia was performed using a single intraperitoneal barbiturate injection (Pentothal 75 mg/kg). The animals were intubated and ventilated on a dedicated small-animal device (PhysioSuite MouseVent™, Kent Scientific®, Torrington, USA) according to a protective lung ventilation protocol (tidal volume 7 ml/kg in two-lung ventilation decreased to 6 ml/kg in OLV ; positive end-expiratory pressure 4 cmH₂O ; respiratory rate 80/min ; I/E ratio =1). All animals were given a unique subcutaneous injection of 0,04 mg/kg Buprenorphine before extubation.

Description of the catheterization procedure

At the end of follow-up (D3, D7 or D28), the animals were anesthetized with Pentotal (75 mg.kg⁻¹ ip.), then intubated with a 14G cathlon before being placed under mechanical ventilation (PhysioSuite® MouseVent® - Kent Scientific) with a protective protocol (tidal volume 6 ml.kg⁻¹, inspired fraction of O₂ 21%, respiratory rate 80 / min, PEEP 4 cmH₂O, I / E ratio = 1/2).

The invasive measurements were carried out under aseptic conditions. After dissection of the internal jugular vein, a polyurethane catheter (Argyle™ Polyurethane Umbilical Vessel Catheter, Single Lumen, 2.5 Fr / Ch (0.8 mm) x 12 ", Covidien®, Dublin, Irland) was introduced into the right internal jugular vein, up to the right ventricle and the pulmonary artery. Then the right carotid artery was dissected and another vinyl catheter was inserted into the right carotid artery to measure systemic blood pressure.

The catheters were purged with heparinized 0.9% saline (50 IU heparin per ml of physiological saline). The extremity of the catheter was connected to a pressure cell and a pressure monitor (AD Instruments®), itself connected to a laptop. The cell was calibrated with a point at 0 mmHg and a point at 100 mmHg, the calibration was the same for all the measurements. The pressure acquisitions and analyzes were carried out with LabChart® 7 software (AD Instruments®).

Description of the transthoracic echocardiography protocol

Transthoracic echocardiography exams were performed under spontaneous ventilation with general anesthesia (Isoflurane 2%), by the same technician (Pierre Sicard), blinded to the surgery group. The chest was shaved and ultrasound gel was applied to improve echogenicity. All examinations were performed with the Vevo 2100 (VisualSonics®) device, with continuous monitoring of heart rate, respiratory rate, and body temperature. The examination used mainly four views (see Figure below and supplementary videos):

parasternal long axis (LAX), parasternal short axis (SAX), parasternal short axis centered on the aorta (SAXaorta), and four-chamber view (4C).

The parameters studied were:

Left heart:

- Dimensions: LV outflow tract diameter (mm), systolic and diastolic LV internal diameters (mm), LV end-diastolic area (mm²), LV anterior wall thickness (LVAW, mm), LV posterior wall thickness (LVPW, mm).
- LV systolic function: shortening fraction (SF, %), ejection fraction (EF, %).
- Mitral flow: velocity of the Em wave (mm / s), duration of Em (ms), deceleration time of the Em wave (ms), Am (mm / s), duration of Am (ms).

Right heart:

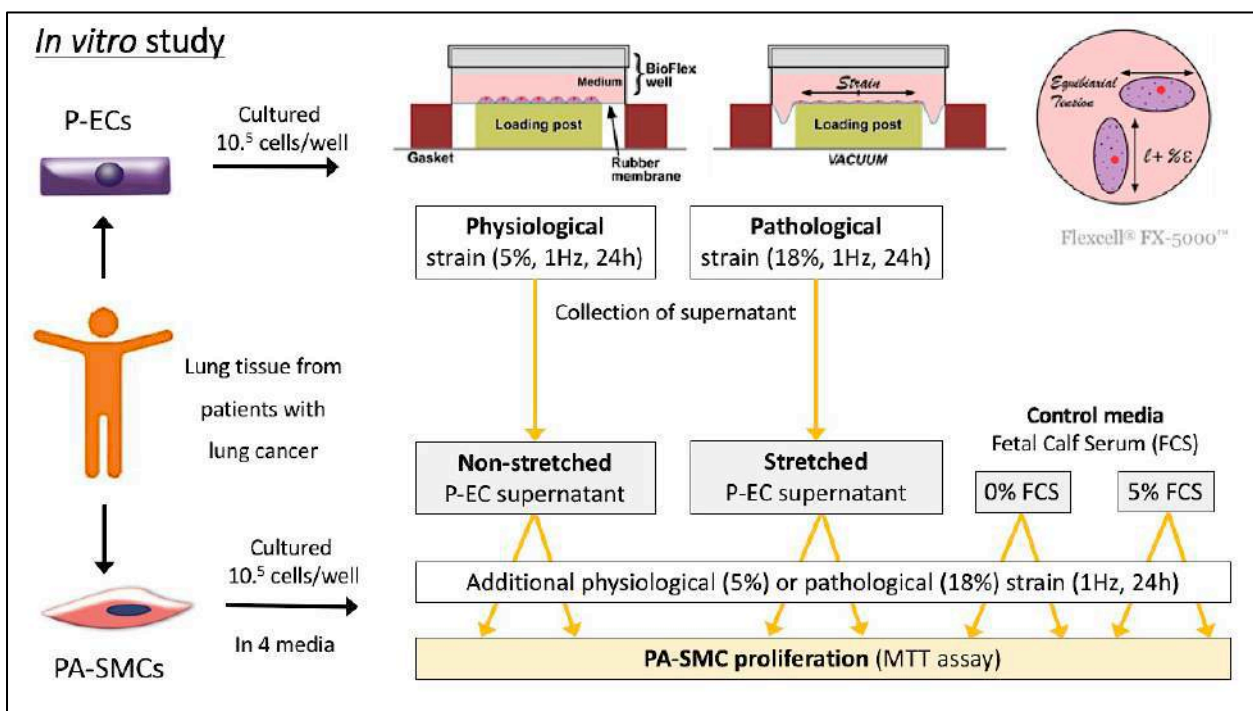
- Dimensions: RV outflow tract (mm), RV end-diastolic diameter (mm), RV end-diastolic area (mm²), RA area (mm²), RV lateral wall thickness (RVLW, mm), Tricuspid valve diameter (mm), RV/LV area ratio (%).
- RV systolic function: RV fractional area change (RVFAC, %), TAPSE in TM mode (mm).
- Tricuspid valve: velocities of the Et wave (mm / s), At (mm / s), Et / At ratio (%).
- Pulmonary valve: pulmonary valve VTI (cm), pulmonary ejection time (PET, ms), systolic acceleration time (PAT, ms), maximum velocity of the pulmonary leak (IP v_{max}, m / s).

Description of the qRT-PCR protocol

The total RNA was isolated from the P-ECs exposed or not to pathological cyclic stretch using Trizol Reagent and qRT-PCR was performed using Light Cycler®480 in multiwall plate 96. Real-time quantitative RT-primers from Applied Biosystems™ (Lifes Technology®, France) were used and internal control 18S rRNA primers were performed. Relative quantification was realized with the comparative 2- $\Delta\Delta C_t$ method by normalization with 18s ribosomal RNA.

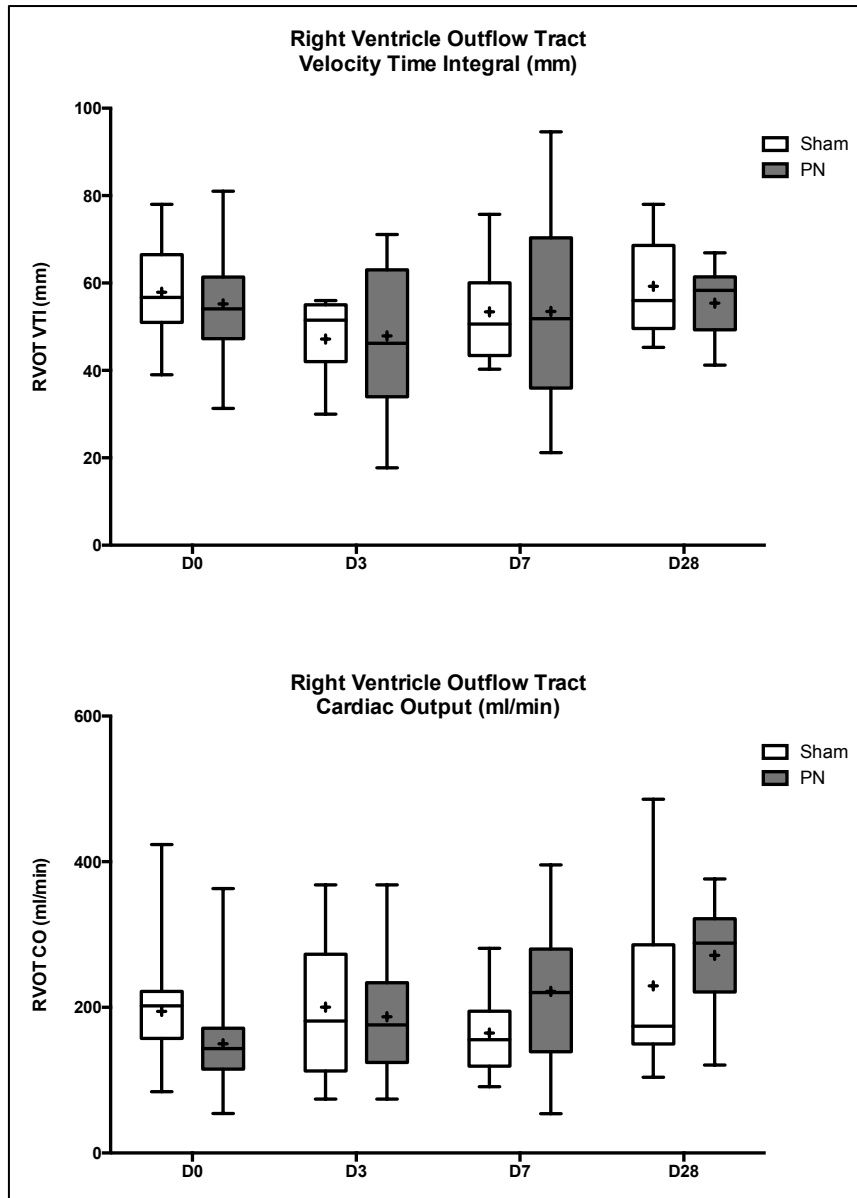
Supplementary Figure S1

Illustrative diagram explaining the in vitro experiments on human P-ECs and PA-SMCs. Seeded P-ECs were exposed over 24h to high magnitude cyclic strains 18% elongation (pathological strain) or 5% (physiological strain) at 1Hz in a FX-5000 Tension Plus™ system (Flexcell®). The P-EC supernatant was collected and added to seeded PA-SMCs, exposed or not to cyclic strain for 24h more. PA-SMC proliferation was also assessed under control media, 0% and 5% fetal calf serum (minimal and maximal proliferation capacity respectively). At the end of the exposure period, the cell proliferation was measured using tetrazolium salt (MTT) assay. [FCS = fetal calf serum ; PA-SMC = pulmonary artery smooth muscle cell ; P-EC = pulmonary endothelial cell].



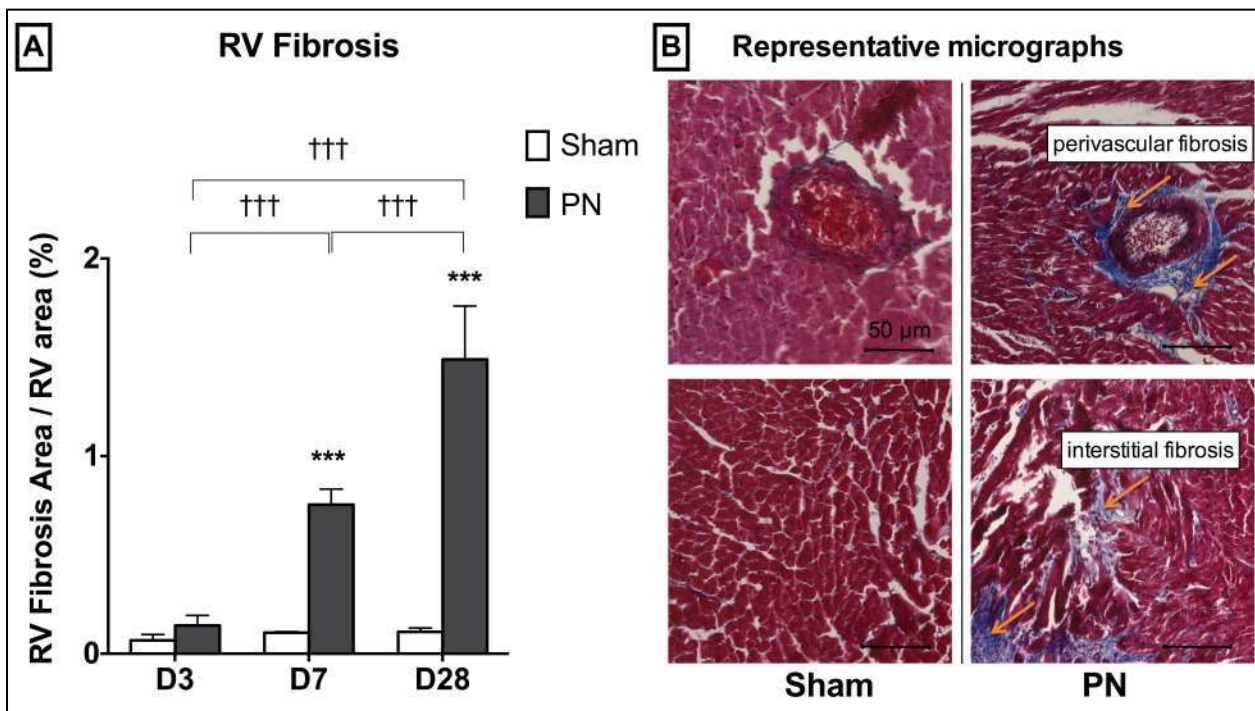
*IV. 1. 1. 5. 1. Supplementary Results***Supplementary Figure S2**

Echocardiographic measurements of right ventricle outflow tract (RVOT) velocity time integral (VTI, in mm) and cardiac output (CO, in ml/min) in the sham and PN groups on D0, D3, D7 and D28 (mean \pm SD, min to max). Two-way ANOVA tests with Sidak correction: (*) adjusted P value < 0.05 for the comparison sham vs. PN at the same time-course. [D0, D3, D7, D28 = baseline, postoperative day 3, 7, 28 ; PN = pneumonectomy ; RV = right ventricle].



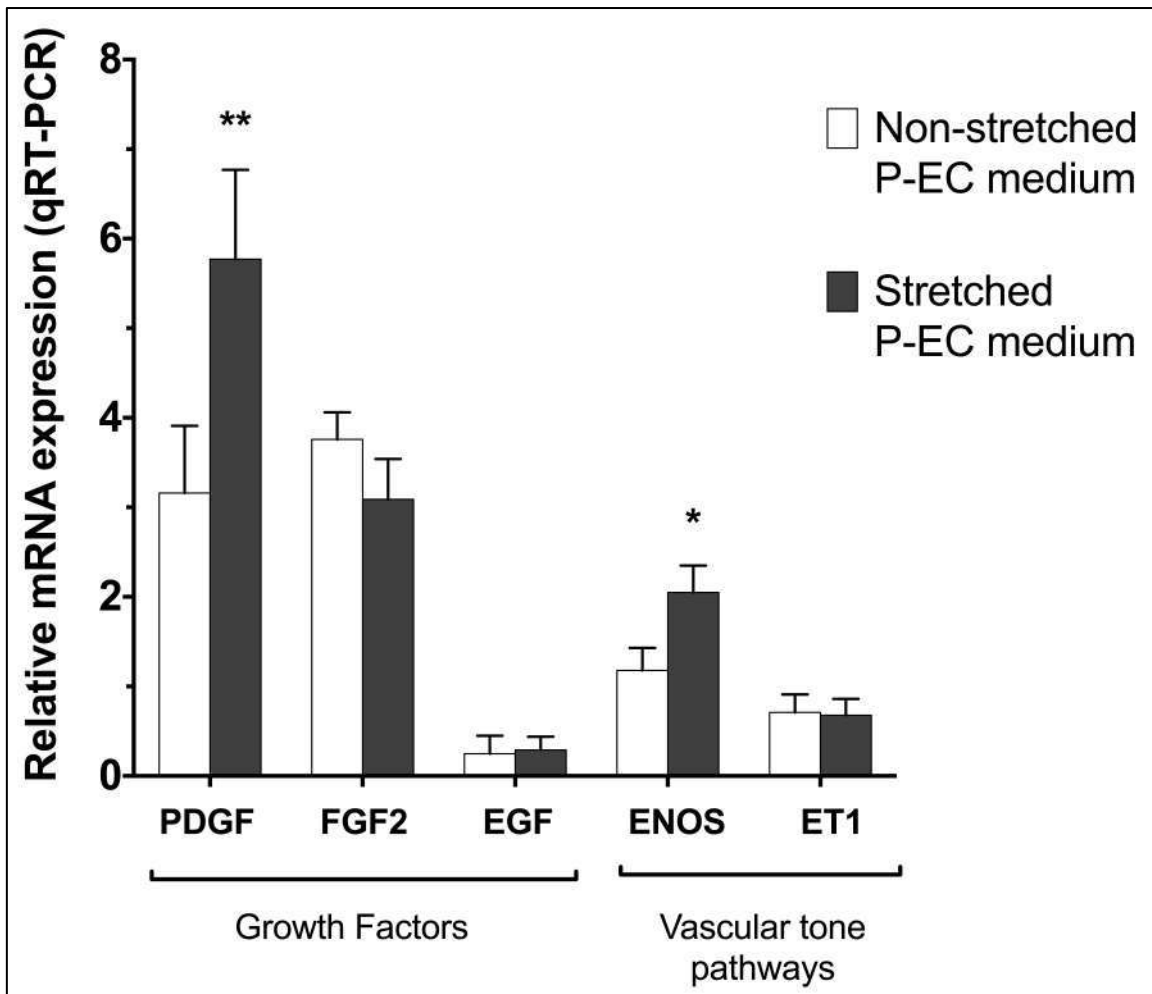
Supplementary Figure S3

Right ventricle fibrosis. Quantification of RV fibrosis in the sham and PN groups, on D3, D7 and D28 (percentage, mean \pm SD) (A). Representative micrographs from Masson's Trichrome stained sections of right ventricle from sham and PN rats on D28, illustrating the RV remodeling process in the PN group (scale bar indicates 50 μ m) (B). Two-way ANOVA tests with Sidak correction. Adjusted P value (*) < 0.05, (**) < 0.01, (***) < 0.001 for comparing sham vs. PN at each time point. Adjusted P value (\dagger) < 0.05, ($\dagger\dagger$) < 0.01, ($\dagger\dagger\dagger$) < 0.001 for comparing time effect in each group. [D3, D7, D28 = postoperative day 3, 7, 28 ; PN = pneumonectomy].



Supplementary Figure S4

Quantification of mRNA level in stretched P-ECs (grey bars) or non-stretched P-ECs (white bars) after 24h of mechanical cyclic stretch stimulation. The expression level of the genes of interest was computed relative to the mRNA expression level of the internal standard r18S (arbitrary units, mean \pm SD). Unpaired t tests: P value < 0.05 (*); $P < 0.01$ (**). [PDGF = platelet-derived growth factor ; FGF2 = basic fibroblast growth factor ; EGF = epidermal growth factor ; ENOS = endothelial nitric oxide synthase ; ET1 = endothelin 1 ; P-EC = pulmonary endothelial cell].



Supplementary Table S1

Characteristics of patients from whom the human P-ECs and PA-SMCs were isolated, cultured, and used for the in vitro study. Cells were isolated from patients free from pulmonary hypertension and COPD, lung specimens were collected at a distance from tumor foci. [F = Female ; M = Male].

Patient Number	Age	Sex
CE 1	72	F
CE 2	75	M
CE 3	60	F
CE 4	62	F
CE 5	72	M
CE 6	57	F
CE 7	78	M
CE 8	48	F
CE 9	74	M
CE 10	62	M

Supplementary Table S2

Animal weight (g, mean \pm SD) at baseline, on D3, D7, and D28 in the sham and PN groups. [D0, D3, D7, D28 = baseline, postoperative day 3, 7, 28 ; PN = pneumonectomy].

Animal weight (g, mean \pm SD)	D0	D3	D7	D28
Sham	395 \pm 17	374 \pm 24	413 \pm 19	543 \pm 22
PN	388 \pm 15	358 \pm 19	371 \pm 15	521 \pm 12

IV. 1. 1. 6. Résultats supplémentaires absents du « *Supplementary Appendix* »

IV. 1. 1. 6. 1. Effets de la pneumonectomie à 2 mois

En pratique clinique, il est bien documenté que l'hypertension pulmonaire après pneumonectomie est encore observée jusqu'à 6 à 12 mois après la chirurgie [37,123]. Dans notre modèle animal, nous avons évalué les effets de la pneumonectomie droite seulement à 1 mois. Il était donc fortement probable que soit demandée une évaluation à un temps plus tardif. Nous avons anticipé une telle demande de la part des « reviewers », et avons réalisé une évaluation à 2 mois. Ces expériences ont été conduites quelques mois seulement après la fin de l'étude principale à 1 mois. Les résultats à deux mois ont été fournis à la revue *Anesthesiology*, mais l'article a été refusé pour d'autres raisons.

Deux mois après pneumonectomie droite, l'HTP était toujours présente avec une sévérité modérée, associée à un pourcentage très élevé de muscularisation ([Supplementary Table S3](#)). Dans notre modèle, la sévérité de l'HTP post-pneumonectomie semble rester stable dans le temps. Nous ne pensons pas que l'HTP devienne sévère comme on peut l'observer dans le modèle monocrotaline. En fait, le processus de remodelage vasculaire doit certainement s'arrêter de lui-même après qu'un nouvel équilibre soit atteint entre l'élévation régionale du flux sanguin et le niveau de muscularisation des artères pulmonaires « recevant » cette augmentation de flux sanguin. Nous pensons que la croissance du poumon controlatéral et la néoangiogénèse dans le poumon restant sont des mécanismes de protection vis-à-vis de l'HTP. Il est probable que ces deux mécanismes de protection ralentissent la progression de la maladie. Cependant, nous ne pensons pas que ce remodelage soit réversible.

Supplementary Table S3. Evaluation dans les groupes sham et PN (pneumonectomie) à 2 mois.

	sham D56 (n = 5)	PN D56 (n = 10)
Catheterization		
Mean PAP (mmHg, mean ±SD)	18 ±2	32 ±10
RV systolic pressure (mmHg, mean ±SD)	28 ±4	50 ±8
Echocardiography		
RV / LV ratio	0,42 ±0,03	1,06 ±0,25
LV anterior wall diameter (mm, mean ±SD)	1,88 ±0,29	2,01 ±0,43
RV lateral wall diameter (mm, mean ±SD)	0,93 ±0,19	1,61 ±0,21
LV ejection fraction (% , mean ±SD)	68 ±9	55 ±16
RV fractional area change (% , mean ±SD)	42 ±7	52 ±6
Gravimetry		
RV hypertrophy index (% , mean ±SD)	29 ±5	45 ±5
Muscularization of distal pulmonary arteries		
Non muscularized vessels (% , mean ±SD)	84 ±2	6 ±2
Partially muscularized vessels (% , mean ±SD)	11 ±2	8 ±2
Muscularized vessels (% , mean ±SD)	5 ±2	86 ±2

IV. 1. 1. 6. 2. Evaluation de l'hématose par gazométrie artérielle

Les résultats de la gazométrie artérielle réalisée au moment du cathétérisme étaient globalement normaux et comparables entre les groupes (Tableau S4).

Supplementary Table S4. Résultats de la gazométrie artérielle réalisée après le cathétérisme (moyenne \pm SEM) chez les rats du groupe sham et PN, au 3^{ème}, 7^{ème}, et 28^{ème} jours postopératoires.

	D3		D7		D28	
	sham	PN	sham	PN	sham	PN
PaO2 (mmHg)	96 \pm 12	98 \pm 3	92 \pm 6	77 \pm 9	83 \pm 5	86 \pm 4
PaCO2 (mmHg)	24 \pm 1	22 \pm 1	27 \pm 1	35 \pm 6 (†)	35 \pm 1	33 \pm 3 (§)
pH artériel	7.55 \pm 0.01	7.59 \pm 0.02	7.53 \pm 0.01	7.41 \pm 0.03 (* , †)	7.44 \pm 0.01 (§)	7.46 \pm 0.02 (§)
SaO2 (%)	95 \pm 1	96 \pm 1	95 \pm 1	88 \pm 4 (†)	91 \pm 2	93 \pm 1
HCO3- (mmol/L)	21 \pm 01	19 \pm 1	22 \pm 1	22 \pm 2	23 \pm 1	22 \pm 1
Hémoglobine (g/dl)	17 \pm 1	18 \pm 1	17 \pm 1	17 \pm 1	17 \pm 1	17 \pm 1
Hématocrite (%)	42 \pm 2	44 \pm 1	44 \pm 2	44 \pm 3	48 \pm 6	42 \pm 1
Na (mmol/L)	137 \pm 2	136 \pm 1	138 \pm 1	140 \pm 1	139 \pm 1	138 \pm 1
K (mmol/L)	3.6 \pm 0.1	4.6 \pm 0.2	4.3 \pm 0.1	4.9 \pm 0.3	4.0 \pm 0.1	4.6 \pm 0.2

(*) : adjusted *P* value < 0.05 pour la comparaison sham vs PN au sein d'un même *time-point*

(†) : adjusted *P* value < 0.05 pour la comparaison J3 vs J7 dans un même groupe

(‡) : adjusted *P* value < 0.05 pour la comparaison J7 vs J28 dans un même groupe

(§) : adjusted *P* value < 0.05 pour la comparaison J3 vs J28 dans un même groupe

La PaO2 et SaO2 étaient correctes dans tous les groupes, à l'exception du groupe PN D7 où la PaO2 était sensiblement plus basse que dans les autres groupes (*P* = *ns*) avec une SaO2 qui restait acceptable, en moyenne 88 \pm 4%. Cette diminution de SaO2 chez les PN D7 était probablement liée à des valeurs très basses de PaO2 chez 3 animaux du groupe PN D7. Dans tous les cas, cette diminution du niveau d'oxygénation dans le groupe PN D7 était cliniquement trop modeste pour modifier les résistances artérielles pulmonaires via le phénomène de vasoconstriction hypoxique.

Bien qu'ayant les mêmes paramètres ventilatoires, le pH variait entre les groupes, avec plutôt une alcalose respiratoire avec hypocapnie dans les groupes sham D3, PN D3 et sham D7 alors que le pH était normal avec normocapnie dans les groupes PN D7, sham D28 et PN D28. Cette différence était certes significative sur le plan statistique mais modeste sur le plan clinique, avec des répercussions certainement négligeables sur les résistances artérielles pulmonaires. La tolérance métabolique des rats était globalement comparable.

Enfin, l'hémoglobine et l'hématocrite des rats étaient normaux dans les deux groupes et à tous les temps postopératoires. Aucune anémie post-opératoire n'était observée.

IV. 1. 1. 6. 3. Résultats détaillés de la gravimétrie

Les résultats détaillés de la gravimétrie post-mortem sont détaillés dans le Tableau S5 ci-dessous.

Supplementary Table S5. Résultats de la gravimétrie réalisée dans les groupes sham et PN au 3^{ème}, 7^{ème}, et 28^{ème} jours postopératoires : poids des organes normalisés par le poids de l'animal, indice de Fulton et Wet/Dry Ratio (moyenne \pm SEM).

	J3		J7		J28	
	sham	PN	sham	PN	sham	PN
Poids animal (g)	374 \pm 8	358 \pm 5	413 \pm 7 (†)	371 \pm 5 (*)	543 \pm 7 (‡, §)	521 \pm 4 (‡, §)
Δ poids vs D0 (g)	- 24 \pm 7	- 27 \pm 6	12 \pm 3	- 23 \pm 6 (*)	150 \pm 6	134 \pm 6
Cœur (mg)	1309 \pm 32	1305 \pm 25	1395 \pm 44	1166 \pm 36	1627 \pm 46	1854 \pm 69
Cœur normalisé (mg/g)	3.5 \pm 0.1	3.7 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1 (†)	3.0 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2 (*)
VD (mg)	241 \pm 10	299 \pm 12	245 \pm 9	303 \pm 12	316 \pm 13	549 \pm 33
VD normalisé (mg/g)	0.65 \pm 0.03	0.83 \pm 0.03 (*)	0.60 \pm 0.02	0.82 \pm 0.04 (*)	0.58 \pm 0.02	1.05 \pm 0.06 (*, ‡, §)
VG+S (mg)	855 \pm 29	773 \pm 19	888 \pm 20	705 \pm 18	1098 \pm 31	1003 \pm 38
VG+S normalisé (mg/g)	2.3 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1 (†)	2.0 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1
RVHI (Fulton) (%)	28 \pm 1	39 \pm 1 (*)	28 \pm 1	43 \pm 2 (*)	29 \pm 2	55 \pm 3 (*, ‡, §)
Wet / Dry Ratio	4.9 \pm 0.1	5.5 \pm 0.1 (*, ‡, §)	4.8 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1

(*) : adjusted *P* value < 0,05 pour la comparaison Sham vs PN au sein d'un même *time-course*

(†) : adjusted *P* value < 0,05 pour la comparaison J3 vs J7 dans un même groupe

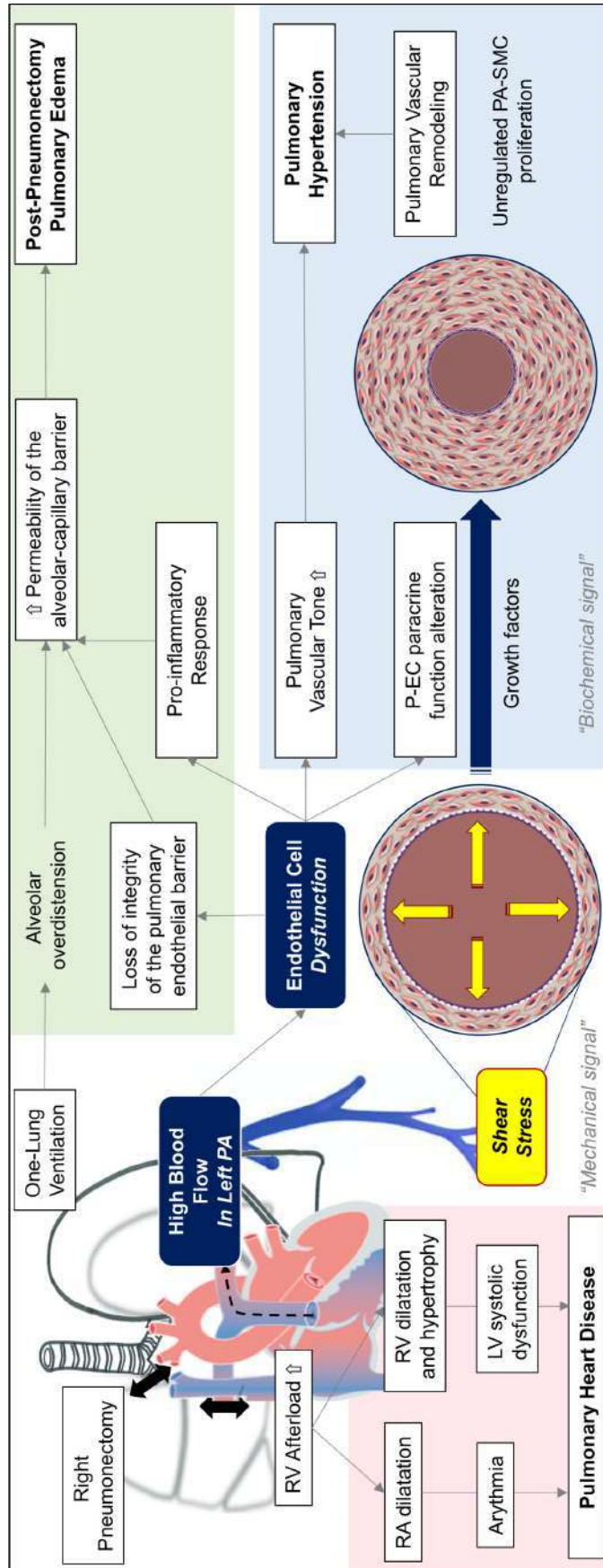
(‡) : adjusted *P* value < 0,05 pour la comparaison J7 vs J28 dans un même groupe

(§) : adjusted *P* value < 0,05 pour la comparaison J3 vs J28 dans un même groupe

IV. 1. 1. 6. 4. Supplementary « Graphical Abstract »

Graphical Abstract. Main mechanisms leading to pulmonary hypertension and heart disease after pneumonectomy.

[LV = left ventricle ; PA = pulmonary artery; PA-SMC = pulmonary artery smooth muscle cell ; P-EC = pulmonary endothelial cell ; RA = right atrium ; RV = right ventricle].



IV. 1. 1. 7. Conclusion sur l'étude E1

Dans notre modèle *in vivo*, nous avons fourni un aperçu complet de la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire et du remodelage du cœur droit au cours du premier mois suivant la pneumonectomie droite. Selon nos résultats, l'hypertension pulmonaire est modérée et ne semble pas être un processus réversible. La force et la nouveauté de nos recherches résident dans la combinaison de découvertes *in vivo* chez le rat avec des expériences *in vitro* sur des cultures de cellules humaines pulmonaires, offrant de nouvelles perspectives sur l'hypertension pulmonaire liée à l'hyperdébit. Nous avons tenté de souligner la pertinence majeure et la valeur translationnelle du modèle *in vitro*. Nous avons mis en évidence pour la première fois l'impact de l'étirement cyclique (qui est bien corrélé à la contrainte de cisaillement) sur la fonction paracrine des cellules endothéliales pulmonaires. Le PDGF semble être l'un des principaux facteurs de croissance impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses liée au *shear stress*. Il est bien connu que le PDGF joue un rôle majeur dans le remodelage vasculaire lié au flux. Le gène codant pour PDGF est régulé par un élément sensible au *shear stress* (SSRE, *shear stress responsive element*), ce qui corrobore nos résultats et représente un intérêt majeur en thérapeutique.

IV. 1. 2. ETUDE E2 : INFLUENCE DE LA MUTATION BMPR2 SUR L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE.

Nous tenons à remercier Frédéric Perros de l'unité INSERM U999 *Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique* (Université Paris Sud, Hôpital Marie-Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France), de nous avoir permis de mener des expériences sur sa lignée de rats mutés pour le BMPR2 « $\Delta 71$ » [114].

IV. 1. 2. 1. Cathétérisme pulmonaire

Le cathétérisme pulmonaire ne retrouvait pas de différence significative de PAPm ou de PAPs entre les groupes PN « sauvage » et PN « BMPR2 $\Delta 71$ ». L'HTP n'était pas plus sévère chez les rats mutés pour le BMPR2 (résultats non présentés).

IV. 1. 2. 2. Echographie cardiaque

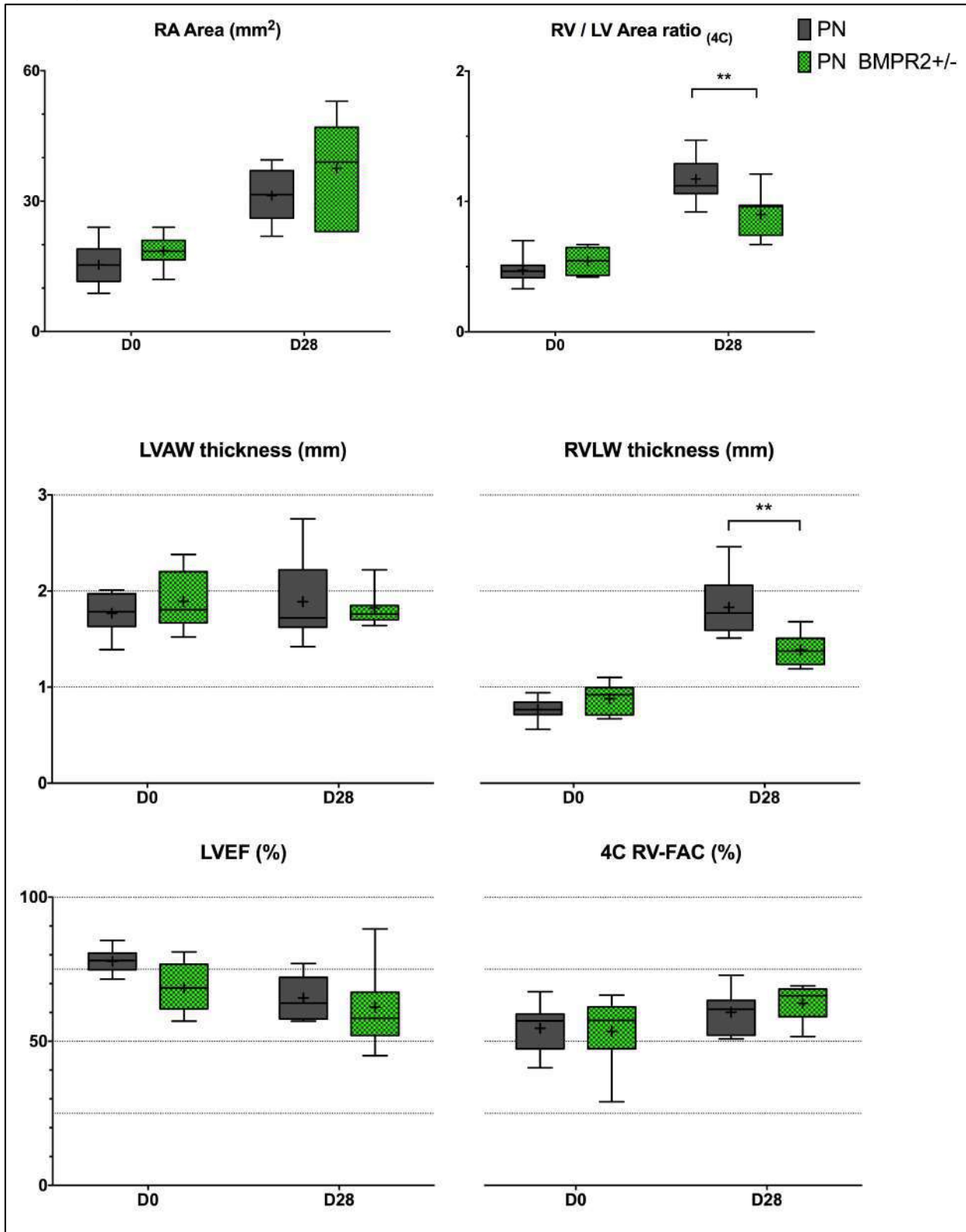
Les rats du groupe PN « sauvage » et PN « BMPR2 $\Delta 71$ » avaient des oreillettes droites de taille similaire à D28. Le rapport des surfaces VD/VG était élevé à D28 dans les deux groupes, légèrement supérieur dans le groupe PN « sauvage ». De même, la paroi latérale du VD était sensiblement plus hypertrophiée chez les rats « sauvage » que chez les rats « BMPR2 $\Delta 71$ » après pneumonectomie ([Figure IV.1.2.2](#)).

La fonction systolique du VD, évaluée par la RV-FAC, était conservée dans les deux groupes à D28. La fonction systolique du VG, évaluée par la FEVG, était diminuée à D28 par rapport à D0, sans différence significative entre les deux groupes.

IV. 1. 2. 3. Conclusion pour cette étude

Dans la publication de Hautefort *et al.*, les rats mutés « BMPR2 $\Delta 71$ » présentaient une HTAP de phénotype plus sévère que les rats « sauvages », après agression (« hit ») par la monocrotaline ou l'hypoxie chronique [114]. Après pneumonectomie, nous n'avons pas observé ce phénomène, curieusement. Le phénotype échographique semblait même plus favorable chez les rats mutés « BMPR2 $\Delta 71$ » que chez les rats « sauvages ». N'ayant pas observé de différence de PAP par cathétérisme, nous n'avons pas poussé plus loin les explorations. Etant en contradiction avec la littérature, il est certain que nos expériences de pneumonectomie droite devraient être reproduites dans une autre étude chez les rats mutés « BMPR2 $\Delta 71$ », de façon à confirmer ou infirmer nos résultats. Aussi, il serait intéressant de soumettre ces rats mutés à un autre modèle d'HTP liée à l'hyperdébit, comme le shunt aorto-pulmonaire par exemple.

Figure IV.1.2.2. Résultats de l'échographie cardiaque, données « *baseline* » (D0) et au 28^{ème} jour postopératoire (D28) après pneumonectomie droite chez le rat « sauvage » (PN, en gris foncé) ou le rat muté pour le BMPR2 (PN BMPR2 +/-, en vert). Moyenne (croix), médiane, écart type, et *min to max* (** : $P < 0.01$).



RA : right atrium ; RV : right ventricle ; LV : left ventricle ; LVAW : LV anterior wall ; RVLW : RV lateral wall ; LVEF : LV ejection fraction ; RV-FAC : RV fractional area change ; 4C : four chamber ; D0 : baseline ; D28 : postoperative day 28 ; PN : pneumonectomy ; BMPR2 : bone morphogenic protein receptor type 2.

IV. 2. RECHERCHE EXPERIMENTALE : PARTIE II THERAPEUTIQUE

IV. 2. 1. ETUDE T1 : PRE-CONDITIONNEMENT PULMONAIRE EN PREVENTION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE DROITE CHEZ LE RAT.

IV. 2. 1. 1. Caractéristiques initiales des deux groupes

Les caractéristiques initiales des rats étaient comparables entre les deux groupes (Tableau IV.2.1.1). Le poids des rats traités par pré-conditionnement pulmonaire (PPC) était légèrement plus élevé que les rats non traités (PN). Les paramètres de ventilation mécanique étaient protecteurs dans les deux groupes.

La durée de PPC a été modifiée par rapport au protocole initialement prévu. Face à une mortalité élevée chez les rats traités par PPC, nous avons décidé de réduire la durée de pré-conditionnement. Sur les 10 rats, 2 ont eu 10 clampages de 30 secondes, 3 ont eu 5 clampages de 1 minute, 3 ont eu 5 clampages de 30 secondes, et 2 ont eu 4 clampages de 30 secondes. Ainsi, la durée moyenne d'ischémie pulmonaire dans le groupe PPC était de 3.6 ± 0.5 minutes.

Tableau IV.2.1.1. Paramètres préopératoires et peropératoires (moyennes \pm SEM) des rats dans les groupes PN (pneumectomie) et PPC (pré-conditionnement pulmonaire).

	PN ₁₇ (n = 10)	PPC (n = 10)	P-value
Âge (sem)	10	10	-
Poids (g)	390 \pm 3	404 \pm 5	0.02
Anesthésie			
Pentothal (mg/kg)	74 \pm 3	81 \pm 4	ns
Fréquence cardiaque (/min)	307 \pm 17	369 \pm 12	ns
Durée d'anesthésie (min)	169 \pm 12	182 \pm 6	ns
Durée de chirurgie (min)	50 \pm 2	48 \pm 1	ns
Buprénorphine (μ g/kg)	97 \pm 6	60 \pm 12	ns
Ventilation mécanique			
V _T en bi-pulmonaire (ml/kg)	7.0 \pm 0.2	6.9 \pm 0.2	ns
V _T en uni-pulmonaire (ml/kg)	6.0 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1	ns
Fréquence respiratoire (/min)	80	80	-
PEEP (cmH ₂ O)	4	4	-

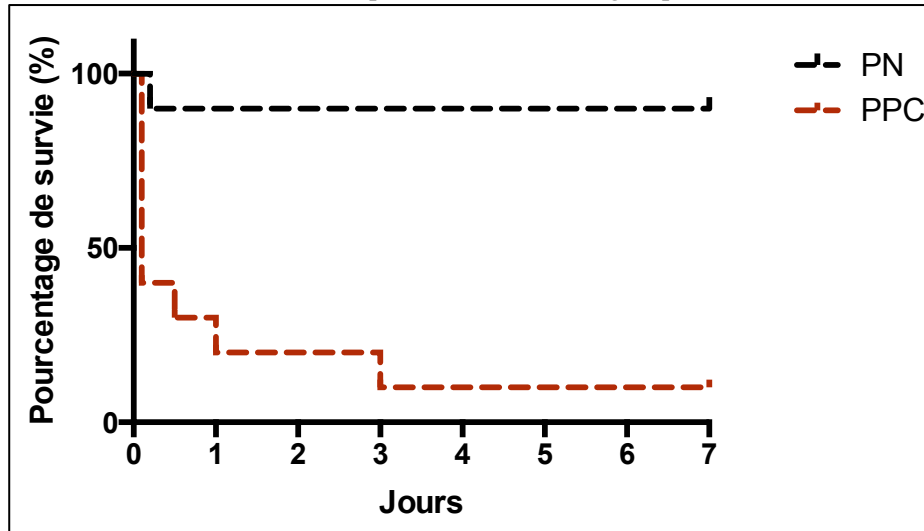
PN : pneumectomie ; PPC : pré-conditionnement pulmonaire ; PEP : pression télé-expiratoire positive ; VT : volume courant (tidal volume).

IV. 2. 1. 2. Résultats de survie

L'étude sur le PPC a dû être interrompue car nous avons observé une surmortalité dans le groupe PPC. En effet dans ce groupe, 9 rats sur 10 (90%) sont décédés précocement, versus 1 rats sur 10 dans le groupe PN (10%), soit un risque relatif de décès à 9 (IC 1.4 — 58.5) ($P < 0.001$). La cause de décès la plus fréquente chez les rats du groupe PPC était le bas débit, venait ensuite l'hémothorax massif.

Les effets du PPC sur la mortalité sont représentés sous forme de courbes de survie de *Kaplan-Meier* (Figure IV.2.1.2). La probabilité de survie était significativement diminuée chez les rats traités par PPC, avec un Hazard Ratio à 14.5 (IC 3.5 — 61.2) pour l'événement « décès à J7 » (Log Rank test $P < 0.0001$).

Figure IV.2.1.2. Courbes de survie selon Kaplan-Meier dans les groupes PN et PPC.



PN : pneumonectomie ; PPC : pré-conditionnement pulmonaire

IV. 2. 1. 3. Analyses supplémentaires

Avec un seul survivant à J7 dans le groupe PPC, les données échographiques, histologiques et les données de pressions issues du cathétérisme n'ont pas été analysées.

IV. 2. 2. ETUDE T2 : PREVENTION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE APRES PNEUMONECTOMIE DROITE CHEZ LE RAT PAR UN INHIBITEUR SELECTIF DU *PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BETA RECEPTOR*.

IV. 2. 2. 1. Introduction brève

Il est bien décrit que la voie du PDGF joue un rôle important dans l'HTAP idiopathique chez l'homme [93]. Les cellules endothéliales pulmonaires sont constamment exposées aux contraintes mécaniques de cisaillement générées par le débit sanguin. Ces contraintes mécaniques peuvent influencer l'expression génique des cellules endothéliales tapissant le vaisseau. Dans des modèles de culture cellulaire, il est prouvé que le shear stress augmente le niveau de transcription de PDGF-B par activation directe d'un élément SSRE (*shear stress responsive element*) situé sur la région cis du promoteur du gène [98,99,103]. Ainsi les études précédentes corroborent nos résultats, à savoir l'activation de la voie PDGF dans notre modèle *in vitro* de *shear stress* (Supplementary Figure 4). L'inhibition de la voie PDGF pourrait être une cible thérapeutique.

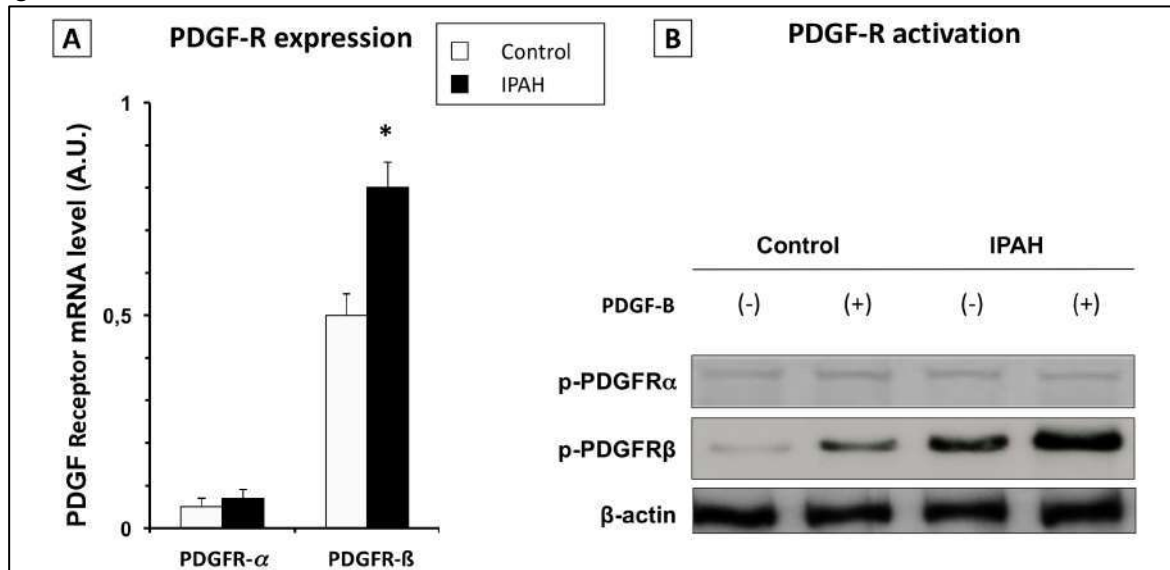
IV. 2. 2. 2. Implication de la voie du PDGF-B / PDGFR-Béta dans l'HTAP

Des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires ont été isolées chez des patients atteints d'HTAP idiopathique et chez des patients contrôles. L'expression génique des récepteurs au PDGF alpha et béta était explorée par q-RT-PCR. Le récepteur PDGFR-Béta était plus exprimé que le PDGFR-alpha dans les CML. De plus, le récepteur PDGFR-Béta était davantage exprimé chez les patients atteints d'HTAP que chez les patients sains (Figure IV.2.2.2A).

Ensuite, nous avons quantifié les formes phosphorylées des récepteurs PDGFR-alpha et PDGFR-béta par *Western Blot.*, dans les CML de sujets sains et sujets HTAP, en présence ou non du ligand PDGF-B. Nos expériences ont montré que la forme phosphorylée du récepteur PDGFR-béta était surexprimée chez les sujets atteints d'HTAP. D'autre part, la présence de PDGF-B dans le milieu de culture stimulait de façon sélective le récepteur PDGFR-béta, chez les sujets sains et chez les sujets HTAP (Figure IV.2.2.2B).

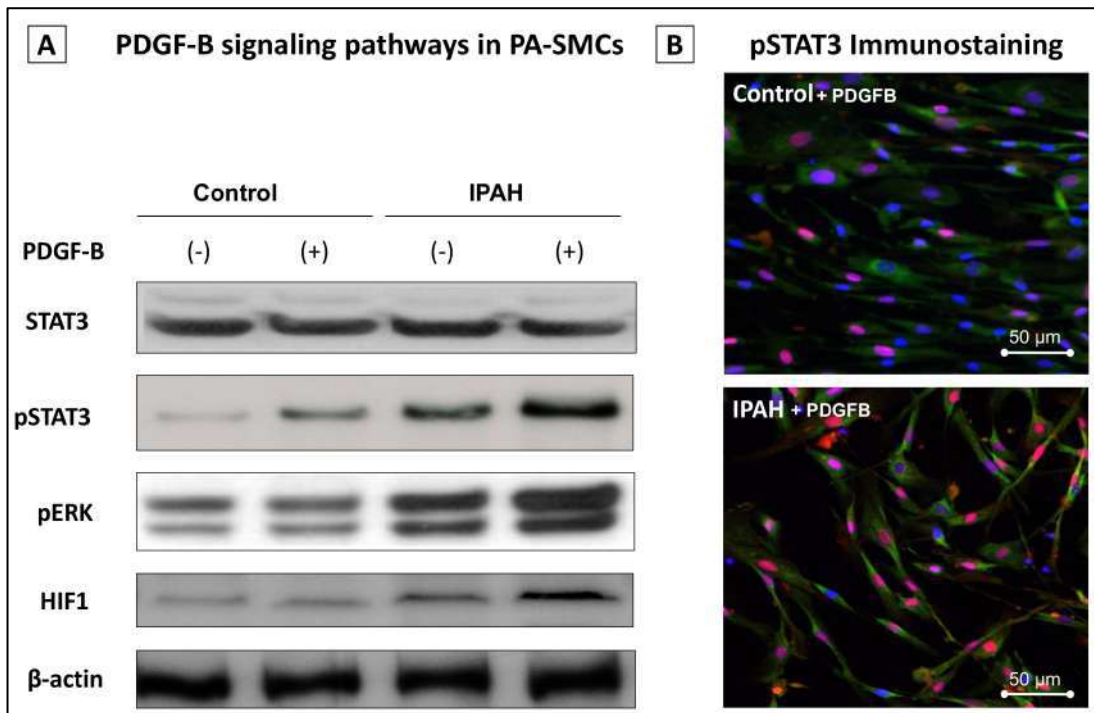
Dans les cellules musculaires lisses, les voies de signalisation du PDGF-B sur son récepteur PDGFR-béta ont été explorées, notamment STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) et sa forme phosphorylée pSTAT3, pERK (*extracellular signal-regulated kinase*) et HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*). Le PDGF-B activait les formes phosphorylées pSTAT3 et pERK, ainsi que HIF-1. L'activation de la voie pSTAT3 était plus marquée chez les sujets HTAP. Les effets du PDGF-B sur l'activation de la voie pSTAT3 étaient plus prononcés dans les cellules musculaires lisses de sujets d'HTAP que chez les sujets sains (Figure IV.2.2.2.1). Ainsi, dans l'HTAP idiopathique, c'est surtout l'isoforme BB du PDGF et son récepteur PDGF-R β qui sont surexprimés dans le lit vasculaire pulmonaire et jouent un rôle clé.

Figure IV.2.2.2. (A) : Dosage par q-RT-PCR des ARN messagers des récepteurs PDGFR-alpha et bêta dans les cellules musculaires lisses de sujets sains et atteints d'HTAP idiopathique (A.U., *arbitrary unit*). (B) : *Western Blot assay* montrant l'activation des récepteurs PDGFR- α et PDGFR- β dans les cellules musculaires lisses de sujets sains et atteints d'HTAP, en présence ou non de PDGFB à la concentration de 10 ng/ml.



PDGFB : platelet-derived growth factor ; PDGFR-R : PDGFB Receptor ; mRNA : messenger ribonucleic acid ; IPAH : idiopathic pulmonary arterial hypertension ; A.U. : arbitrary unit.

Figure IV.2.2.2.1. (A) : *Western Blot* montrant l'activation de STAT3, ERK, et HIF-1 dans les cellules musculaires lisses de sujets sains et atteints d'HTAP, en présence ou non de PDGFB à la concentration de 10 ng/ml. (B) : Images microscopiques (grossissement 40x) de colorations immuno-histo-chimiques de pSTAT3 (noyaux pSTAT3+ en rouge, et DAPI+ en bleu) dans les cellules musculaires lisses de sujets sains et atteints d'HTAP.

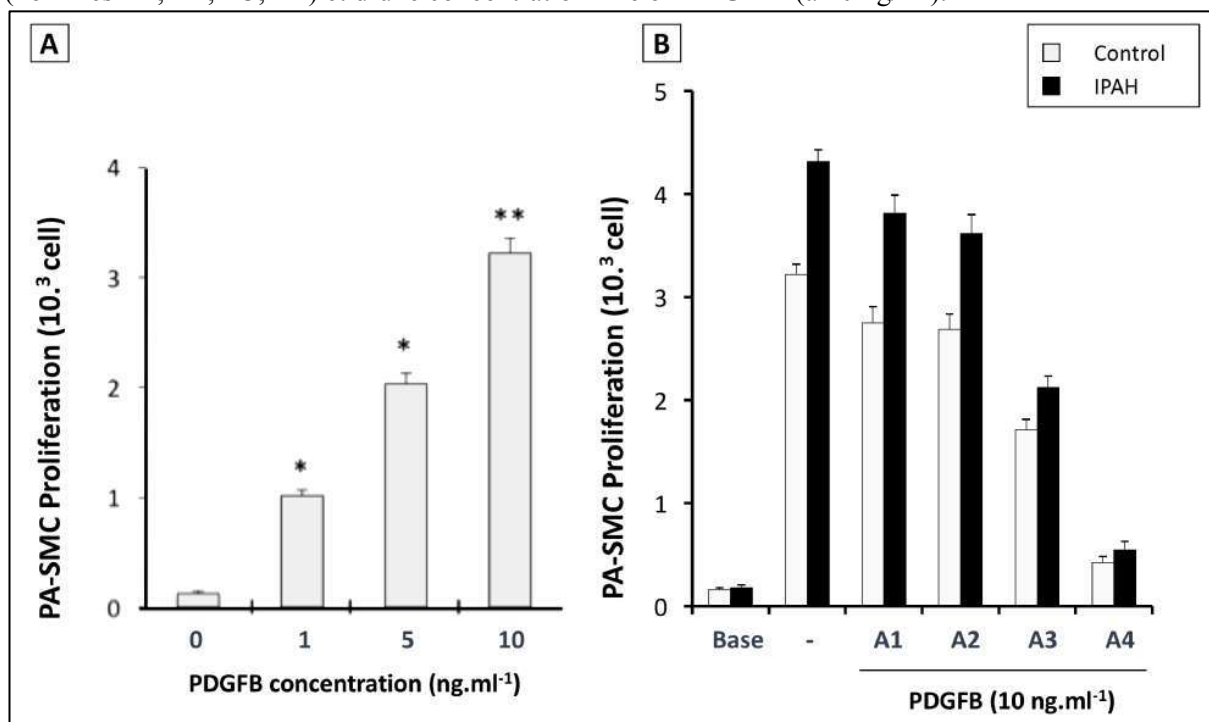


PDGFB : platelet-derived growth factor ; STAT3 : signal transducer and activator of transcription-3 ; pSTAT3 : STAT3 phosphorylée ; pERK : phosphorylated extracellular signal-regulated kinase ; HIF-1 hypoxia-inducible factor-1.

IV. 2. 2. 3. Développement d'un antagoniste compétitif sélectif du PDGFR- β

Nous avons testé 4 peptides différents, nommés A1, A2, A3, et A4, ayant tous des propriétés d'antagoniste compétitif sur le récepteur PDGFR- β (Institut des Biomolécules Max de Mousseron, IBMM, Montpellier, France). Les effets de ces 4 peptides ont d'abord été testés *in vitro*, sur la croissance des cellules musculaires lisses en présence d'une concentration fixe de PDGF-B déterminée *a priori* à 10 ng/ml (Figure IV.2.2.3A). L'inhibiteur nommé « A4 » était le plus puissant (Figure IV.2.2.3B). C'est cette molécule que nous avons ensuite testée dans les modèles animaux d'hypertension pulmonaire.

Figure IV.2.2.3. (A) : Prolifération des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (PA-SMC) humaines en présence d'une concentration croissante de PDGF-B dans le milieu de culture. (B) : Prolifération des PA-SMCs à l'état basal, en l'absence et en présence de l'un des 4 inhibiteurs du PDGFR- β (nommés A1, A2, A3, A4) et d'une concentration fixe en PDGF-B (à 10 ng/ml).



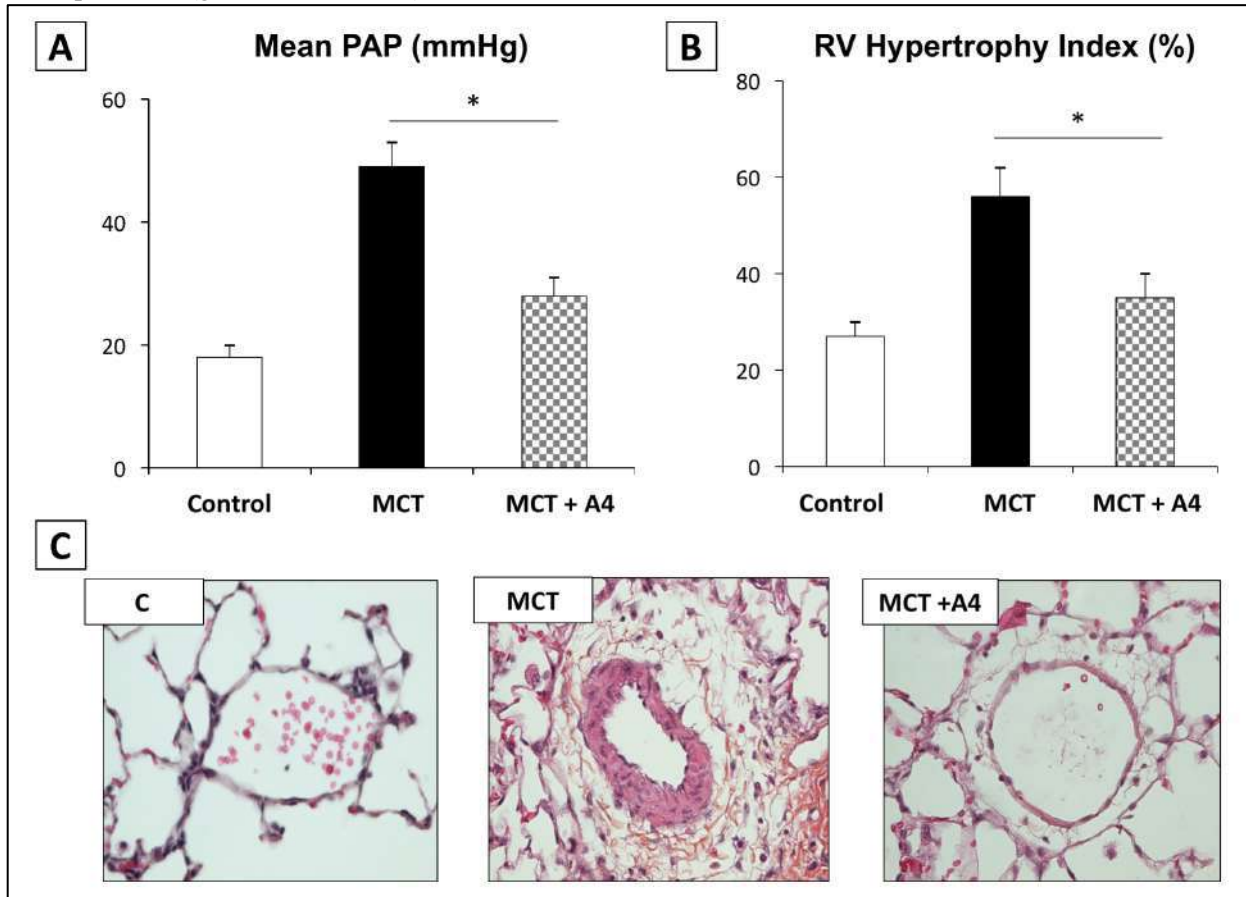
PDGF : platelet derived growth factor ; PA-SMC : pulmonary artery smooth muscle cell

IV. 2. 2. 4. Effets d'un traitement par inhibiteur A4 sur l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat

Les rats étaient randomisés pour recevoir soit un placebo (groupe MCT, n = 10) soit l'inhibiteur A4 (groupe MCT + A4, n = 10) entre le 21^{ème} jour et le 35^{ème} jour après l'injection de monocrotaline (Figure III.2.2.4A, section Méthodes).

L'inhibiteur A4, administré entre D21 et D35, diminuait de façon significative la PAPm et l'indice d'hypertrophie du VD à D35 (Figure IV.2.2.4 A et B respectivement). L'inhibiteur A4 semblait freiner la muscularisation des artères pulmonaires distales (Figure IV.2.2.4C).

Figure IV.2.2.4. (A): Pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm, en mmHg) mesurée à D35 chez les rats contrôles, monocrotaline (MCT), et monocrotaline traités par inhibiteur A4 entre D21 et D35 (moyenne \pm SD) (* : $P < 0.05$). (B): Indice d'hypertrophie du ventricule droit (RVHI, en %) évalué à D35 dans les groupes correspondants. (C): Images microscopiques représentatives d'artères pulmonaires distales sur coupes pulmonaires avec coloration hématoxyline-éosine-safran dans les groupes correspondants (grossissement 40x).



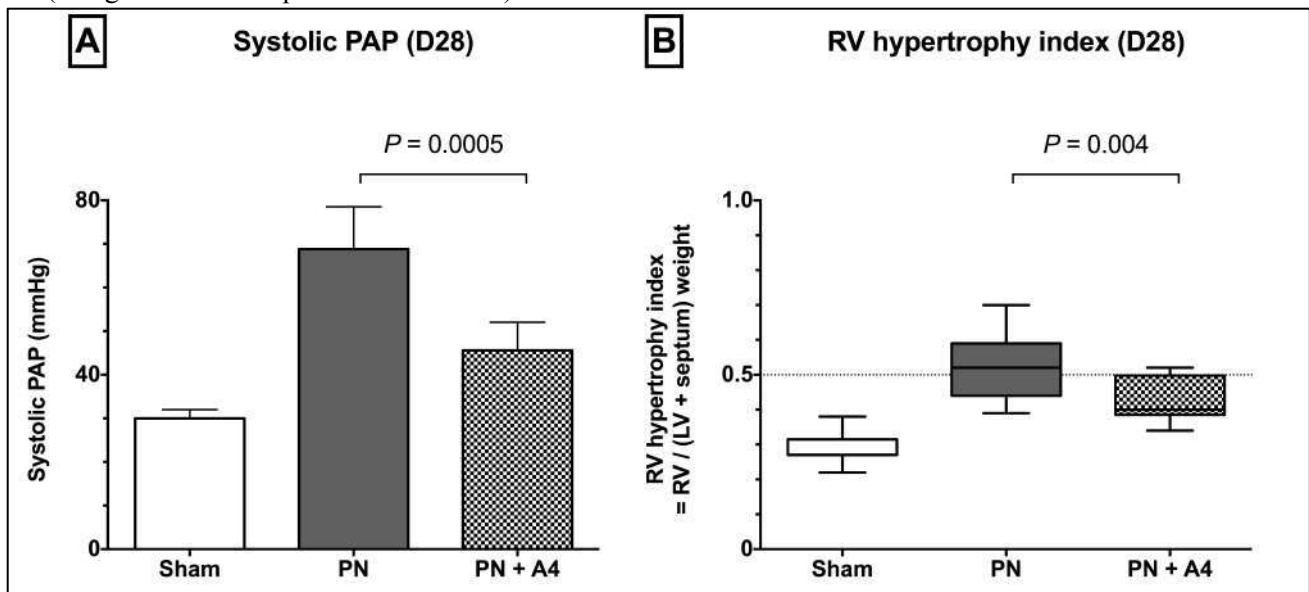
PAP : pulmonary arterial pressure ; RV : right ventricle ; C : control ; MCT : monocrotaline ; A4 : A4 inhibitor (anti-PDGF).

IV. 2. 2. 5. Effets d'un traitement par inhibiteur A4 en prévention de l'hypertension pulmonaire survenant après pneumonectomie chez le rat

Dans le modèle de pneumonectomie droite, les rats étaient randomisés pour être traités soit par placebo (groupe PN, n = 10), soit par inhibiteur A4 (groupe PN + A4, n = 10) dès le jour de la chirurgie, jusqu'au 28^{ème} jour postopératoire (D28) (Figure III.2.2.4B, section Méthodes).

Le traitement par inhibiteur A4 permettait de diminuer la PAP systolique de 69 ± 10 dans le groupe PN à 46 ± 6 mmHg dans le groupe PN+A4 ($P = 0.0005$) (Figure IV.2.2.5A). L'indice d'hypertrophie du VD (RVHI) diminuait de 0.52 ± 0.09 à 0.42 ± 0.06 respectivement ($P = 0.004$) (Figure IV.2.2.5B).

Figure IV.2.2.5 Pression artérielle pulmonaire systolique (*systolic PAP*, en mmHg) (A) et indice d'hypertrophie du ventricule droit (RVHI, ratio sans unité) (B) mesurés au 28^{ème} jour postopératoire (D28) après pneumonectomie droite chez le rat, avec (PN+A4) ou sans (PN) traitement préventif par inhibiteur A4 (antagoniste du récepteur PDGFR- β).



PAP : pulmonary arterial pressure ; RV : right ventricle ; LV : left ventricle ; PN : right pneumonectomy ; A4 : A4 inhibitor (anti-PDGF).

IV. 2. 2. 6. Conclusion

Dans cette partie, nous avons vu que le couple PDGF-B / PDGFR- β jouait un rôle clé dans l'HTAP. Les patients atteints d'HTAP avaient une surexpression du récepteur PDGFR- β à la surface des cellules musculaires lisses. L'effet du PDGF-B sur ce récepteur induit une prolifération des CML par le biais d'une activation de la voie de signalisation intracellulaire STAT3. Les CML issues de patients HTAP sont plus « sensibles » à cette stimulation par PDGF-B et répondent par une croissance plus importante que les CML des sujets sains.

La synthèse d'un antagoniste compétitif du récepteur PDGFR- β , nommé inhibiteur A4, préalablement validé *in vitro*, a permis de diminuer la PAP et le remodelage hypertrophique du ventricule droit dans deux modèles d'HTAP, le modèle monocrotaline, et l'HTP post-pneumonectomie. Cette diminution de PAP était associée à une diminution de la musculation des artères pulmonaires de petit calibre.

IV. 3. RECHERCHE CLINIQUE

IV. 3. 1. ETUDE C1 : MODIFICATIONS PRECOCES DE LA FONCTION VENTRICULAIRE DROITE APRES CHIRURGIE DE RESECTION PULMONAIRE EVALUEE PAR LE 2D-STRAIN EN ECHOCARDIOGRAPHIE : UNE COHORTE PROSPECTIVE (« RESECHO STUDY »).

Original Manuscript

EARLY POSTOPERATIVE RIGHT VENTRICLE FUNCTION ALTERATION ASSESSED BY 2D-STRAIN ECHOCARDIOGRAPHY AFTER PULMONARY RESECTION SURGERY: A PROSPECTIVE COHORT

Pierre Sentenac, M.D.^{1,2} ; Benjamin Bourdois, M.D.^{1,2} ; Lucie Coruble, M.D.¹ ; Laurence Solovei, M.D.³, Nicolas Molinari, M.D., Ph.D.⁴, Saadia Eddahibi, Ph.D.² ; Philippe Gaudard, M.D, Ph.D.^{1,2} ; Géraldine Culas, M.D.¹ ; Pascal H. Colson, M.D., Ph.D.¹ ;

Institutional Affiliations:

⁽¹⁾ Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Arnaud de Villeneuve Teaching Hospital, Montpellier University School of Medicine, Montpellier, France.

⁽²⁾ PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France.

⁽³⁾ Department of Thoracic and Vascular Surgery, Arnaud de Villeneuve Teaching Hospital, Montpellier University School of Medicine, Montpellier, France.

⁽⁴⁾ Biostatistics Department, Montpellier University and Montpellier Teaching Hospital, Montpellier, France

Conflict of Interest: All authors have no conflicts of interest to disclose.

Funding Sources: There is no sponsors, no grants, no relationships with industry. Support for this study was provided solely from institutional and/or departmental sources.

Corresponding Author: Pierre Sentenac

Corresponding Address: Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France ; Mail : dr.sentenac@gmail.com

IV. 3. 1. 1. Introduction

Cette étude a été montée durant mon année de Master II pour réaliser le parallèle « clinique » de l'étude expérimentale chez le rat. Le protocole de l'étude a été écrit grâce au soutien du Docteur Géraldine Culas et du Professeur Pascal Colson. Les inclusions ont été permises grâce à l'aide précieuse de Lucie Coruble puis Benjamin Bourdois, tous deux internes en Anesthésie Réanimation. Cette étude est le sujet de Thèse de Médecine de Benjamin.

Le strain longitudinal de la paroi libre du VD est un marqueur de fonction systolique du VD qui a montré son intérêt dans l'HTAP idiopathique, pathologie dans laquelle il s'altère précocement et possède une bonne valeur pronostique [57,58]. A l'époque à laquelle nous avons rédigé ce protocole, aucune étude clinique n'avait encore exploré les altérations du strain longitudinal de la paroi libre du VD en postopératoire de chirurgie de résection pulmonaire. A ce jour, seules deux études sont parues sur le sujet, toutes deux dans des journaux à faible impact [65,72].

Les résultats de cette étude ont été rédigés directement en anglais, et n'ont pas été traduits en français, faute de temps. Le manuscrit devrait être soumis très prochainement à un journal spécialisé en chirurgie thoracique et cardio-vasculaire. Les Tableaux et Figures relatives à cette partie ont été insérés juste après la conclusion (Paragraphe IV. 3. 1. 10).

IV. 3. 1. 2. Study population

In this prospective study conducted in the Montpellier University Hospital (France), 110 patients scheduled for pulmonary resection surgery from February 2017 to July 2018 were enrolled. Eighteen patients were secondarily excluded, twelve did not meet the echocardiographic quality criteria, five were finally not operated, and one withdrew his consent. Finally, 92 patients were included in the statistical analysis (Figure 1, study flow chart).

The characteristics of study population are listed in Table 1. Mean age was 65 ± 10 and sex ratio was nearly 1:1, 38 patients (41%) had chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 29 (32%) emphysema, and 12 patients (13%) were active smokers. Concerning the cardiovascular status, 37 patients (40%) had arterial hypertension and 11 (12%) had a personal history of coronary artery disease. None of the patients had previous pulmonary hypertension.

Surgeries were lobectomy, bilobectomy and pneumonectomy in respectively 74 (80%), 6 (7%) and 8 (9%) patients, performed by videothoracoscopy in most of cases (65%). Mean durations of surgery and general anesthesia were 170 ± 70 and 260 ± 70 min respectively. All patients were ventilated according to a protective ventilation protocol. Tidal volume was 440 ± 40 mL during double lung ventilation, and 320 ± 50 mL during one-lung ventilation. The protocol for intraoperative fluid administration was restrictive,

with a mean of 1500 ± 500 mL of infused crystalloids. Three patients received blood transfusion for hemorrhage or anemia. Most of patients had thoracic epidural (86%) for postoperative analgesia.

IV. 3. 1. 3. Postoperative alteration of the RVLW longitudinal strain

Eight patients had an altered RVLW strain preoperatively. An altered RVLW strain occurred in 46 of the remaining 84 patients (55%, CI 44—66) during the first 72 hours after surgery. The RVLW strain decreased from $-20 \pm 7\%$ (baseline) to $-19 \pm 7\%$, $-17 \pm 7\%$ and $-16 \pm 6\%$ on postoperative days 1, 2 and 3 respectively ($P = 0.002$) (Figure 2A). The longitudinal strain of the basal, median, and apical segments of the RVLW were homogeneously altered (Figure 2B and Table 2).

IV. 3. 1. 4. Incidence of RV dysfunction diagnosed by the other RV parameters

The RV systolic function parameters based on the tricuspid annular motion were altered less frequently than the RVLW longitudinal strain. The TAPSE was altered (below 17 mm) in 14 patients (15% CI 8—23). The tricuspid S wave was altered (inferior to $10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) in 17 patients (18% CI 10—27).

Pulmonary hypertension, defined by systolic PAP above 35 mmHg, was observed in only 10 patients (11% CI 4—18), and a RV dilatation was highlighted in 13 patients (14% CI 7—21).

IV. 3. 1. 5. Evolution of the echocardiographic parameters over the study period

The postoperative evolution of all echocardiographic parameters is detailed in Table 2 (mean \pm SD). First, the cardiac output dropped by approximately 20% between pre and postoperative values. Mean arterial pressure was lower postoperatively while the heart rate was significantly higher.

The TAPSE decreased from 24 ± 5 on D0 to 21 ± 6 mm on D3 ($P = 0.002$), and the decrease was more pronounced after bilobectomy or pneumonectomy than lobectomy ($P = 0.04$) (Figure 3). However, the RV-FAC and the DTI tricuspid S wave were not significantly altered over time during the study period. Systolic PAP increased moderately over time after surgery, from 19 ± 9 on D0 to 21 ± 11 on D3 ($P = 0.006$), without difference between the lobectomy and the bilobectomy or pneumonectomy groups. Indeed, the type of pulmonary resection did not impact the postoperative PAP in our cohort. On average, the RV did not dilated over time, although there was a trend of increased RV/LV end-diastolic area ratio during the study period ($P = 0.067$).

Concerning the left ventricle function, a modest decrease in LVEF was observed, as well as a decrease in the aortic VTI (Table 2). The Em/Am ratio was significantly lower after surgery and the DTE was shortened.

IV. 3. 1. 6. Evolution of the RV parameters in the “Altered” and “Preserved” RVLW strain groups

Patients who developed an “altered” RVLW longitudinal strain ($n = 46$), defined by a RVLW strain $\geq -15\%$, were compared with patients who showed a “preserved” RVLW longitudinal strain ($n = 38$), defined by a RVLW $< -15\%$.

The DTI tricuspid S wave was significantly lower in the “altered” RVLW longitudinal strain group ([Figure 4](#)). The TAPSE and the RV-FAC showed the same trend without reaching significance. The cardiac output seemed to be lower in the “altered” group, without reaching significance. Systolic PAP did not differ between the two groups.

IV. 3. 1. 7. Correlation between the RVLW longitudinal strain and the other RV systolic parameters

An “altered” RVLW longitudinal strain was weakly concordant with an altered DTI tricuspid S wave (Kappa coefficient = 0.209), but was not concordant with an altered TAPSE (Kappa coefficient = -0.068).

Linear regression showed a modest correlation between the RVLW longitudinal strain values and the DTI tricuspid S wave values ($R^2 = 0.005$; $P < 0.001$). The RVLW longitudinal strain was correlated with neither the TAPSE nor the RV-FAC. These three RV systolic parameters (TAPSE, DTI tricuspid S wave and RV-FAC) were not well correlated with each other. Only the TAPSE and DTI tricuspid S wave were discretely correlated ($R^2 = 0.006$; $P < 0.001$).

IV. 3. 1. 8. Postoperative complications

The postoperative complications are presented in [Table 3](#). An altered RV longitudinal strain was not associated with an increased risk of postoperative complications in our cohort ([Table 4](#)).

IV. 3. 1. 9. Preoperative risk factors for developing an “altered” RVLW strain after surgery

No preoperative parameters were identified as risk factors for developing an “altered” RV strain during the first three days after pulmonary resection surgery ([Table 5](#)).

IV. 3. 1. 10. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que le strain de la paroi latérale du VD s'altérait précocement après chirurgie de résection pulmonaire, chez environ un patient sur deux. Le strain s'altérait de façon homogène sur l'ensemble des segments de la paroi latérale du VD. Les patients qui avaient un RVLW strain « altéré » avaient tendance à avoir davantage d'altérations échographiques sur les autres marqueurs de fonction cardiaque droite que ceux qui avaient un RVLW strain « préservé ». Néanmoins, les valeurs de RVLW strain étaient mal corrélées aux autres paramètres de fonction systolique du VD. Parmi eux, c'est l'onde S en DTI à l'anneau tricuspide qui était le paramètre le mieux corrélé au RVLW strain. Nous n'avons pu, dans cette étude de cohorte, ni déterminer de facteur de risque de développer un RVLW strain altéré, ni établir une association entre RVLW strain altéré et pronostic postopératoire. L'impact de l'altération du RVLW strain en postopératoire de chirurgie pulmonaire devrait être exploré dans les études futures, notamment sur le pronostic à plus long terme.

Table 1. Baseline characteristics of the study population.

Patient characteristic	n = 92
Age, mean \pm SD, years	65 \pm 10
Male, n (%)	49 (53)
ASA score	2 \pm 1
Body mass index, mean \pm SD, kg.m ⁻²	24 \pm 4
Chronic obstructive pulmonary disease, n (%)	38 (41)
Emphysema, n (%)	29 (32)
Active smokers, n (%)	12 (13)
Arterial hypertension, n (%)	37 (40)
Coronary artery disease, n (%)	11 (12)
Preoperative chemotherapy, n (%)	17 (18)
Preoperative radiotherapy, n (%)	11 (12)
Chronic kidney disease, n (%)	15 (16)
Preoperative pulmonary functional test	
Forced expiratory volume in 1 sec, mean \pm SD, L	2.4 \pm 0.7
Vital capacity, mean \pm SD, L	3.3 \pm 0.9
Residual volume, mean \pm SD, L	2.7 \pm 0.5
DLCO, mean \pm SD, % of theoretical value	70 \pm 20
Surgical procedure	
Lobectomy, n (%)	74 (80)
Pneumonectomy, n (%)	8 (9)
Bilobectomy, n (%)	6 (7)
Other, n (%)	4 (4)
Right side, n (%)	53 (58)
Left side, n (%)	39 (42)
Thoracotomy, n (%)	32 (35)
Videothoracoscopy, n (%)	60 (65)
Surgery duration, mean \pm SD, min	170 \pm 71
Anesthesia	
Anesthesia duration, mean \pm SD, min	260 \pm 70
Double lung ventilation, tidal volume, mean \pm SD, mL	440 \pm 40
Double lung ventilation, plateau pressure, mean \pm SD, mmHg	17 \pm 5
One lung ventilation, tidal volume, mean \pm SD, mL	320 \pm 50
One lung ventilation, plateau pressure, mean \pm SD, mmHg	18 \pm 8
Intraoperative fluids, mean \pm SD, mL	1500 \pm 500
Intraoperative transfusion, n (%)	8 (9)
Thoracic epidural, n (%)	79 (86)
Patient controlled analgesia with intravenous morphine, n (%)	13 (14)

DLCO: Diffusing capacity for carbon monoxide; ASA: American Society of Anesthesiologists

Table 2. Echocardiographic parameters after pulmonary resection surgery, from baseline (D0) to the postoperative days 1, 2, 3 (D1, D2, D3). Mean \pm SD. *P* value for mixed model (time effect).

	D0	D1	D2	D3	<i>P</i> value
Clinical and general parameters					
Heart rate (bpm)	78 \pm 13	81 \pm 13	82 \pm 14	85 \pm 15	< 0.001
MAP (mmHg)	108 \pm 18	93 \pm 18	99 \pm 16	101 \pm 16	0.037
Cardiac output (L.min ⁻¹)	4.9 \pm 2.4	4.2 \pm 1.5	4.2 \pm 1.6	4.1 \pm 1.3	0.003
Indexed cardiac output (L.min ⁻¹ .m ⁻²)	2.7 \pm 1.1	2.3 \pm 0.8	2.3 \pm 0.8	2.2 \pm 0.6	0.003
RVLW longitudinal strain					
RVLW (%)	-20 \pm 7	-19 \pm 7	-17 \pm 7	-16 \pm 6	0.002
Apex (%)	-19 \pm 8	-17 \pm 8	-17 \pm 9	-15 \pm 8	0.002
Mid (%)	-20 \pm 8	-19 \pm 8	-18 \pm 8	-17 \pm 6	0.004
Basal (%)	-21 \pm 8	-20 \pm 9	-17 \pm 8	-17 \pm 6	0.003
Other RV parameters					
TAPSE (mm)	24 \pm 5	23 \pm 5	22 \pm 5	21 \pm 6	0.002
DTI S tricuspid wave (cm.s ⁻¹)	13 \pm 3	13 \pm 3	14 \pm 4	14 \pm 4	0.40
RV-FAC (%)	48 \pm 14	46 \pm 14	46 \pm 13	47 \pm 16	0.29
Systolic PAP (mmHg)	19 \pm 9	19 \pm 9	21 \pm 10	21 \pm 11	0.006
RV end diastolic area (cm ²)	18 \pm 5	18 \pm 5	17 \pm 5	17 \pm 5	0.17
Indexed RVEDA (cm ² .m ⁻²)	10 \pm 2	10 \pm 2	10 \pm 2	10 \pm 2	0.19
RV/LV end diastolic area ratio	0.45 \pm 0.12	0.48 \pm 0.12	0.47 \pm 0.10	0.47 \pm 0.11	0.067
Tricuspid annular diameter (mm)	29 \pm 6	30 \pm 4	30 \pm 5	30 \pm 5	0.44
RA area (mm ²)	12 \pm 3	12 \pm 3	12 \pm 3	12 \pm 4	0.97
RVLW thickness (mm)	5 \pm 2	6 \pm 2	5 \pm 2	6 \pm 2	0.78
Tricuspid Et/At ratio	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.4	1.1 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	0.063
LV function					
LVEF (%)	59 \pm 4	58 \pm 5	58 \pm 5	58 \pm 5	0.026
DTI S mitral wave (cm.s ⁻¹)	9 \pm 2	9 \pm 2	10 \pm 3	9 \pm 2	0.44
Aortic VTI (cm)	20 \pm 4	18 \pm 5	18 \pm 4	17 \pm 4	< 0.001
Mitral Em/Am ratio	1.05 \pm 0.37	0.98 \pm 0.29	0.93 \pm 0.26	0.96 \pm 0.28	0.003
Mitral Em/Ea ratio	8 \pm 4	8 \pm 3	8 \pm 3	8 \pm 4	0.53
DTE (ms)	230 \pm 60	210 \pm 60	200 \pm 50	200 \pm 50	< 0.001

TAPSE : tricuspid annular plane systolic excursion ; RVFAC : right ventricle fraction area change ; RA : right atrium ; DTE : deceleration time of E wave.

Table 3. Hospital length of stay and postoperative complications in the study population (n = 92 patients).

Postoperative parameter	N = 92
Postoperative destination, n (%)	
ICU	23 (25)
PACU	69 (75)
Unplanned ICU admission or ICU readmission, n (%)	9 (10)
ICU length of stay, days, mean \pm SD	2.8 \pm 4.9 (n = 28)
PACU length of stay, days, mean \pm SD	1.7 \pm 2.6
Hospital length of stay, days, mean \pm SD	8.5 \pm 6.8
Surgical complications	
Pneumothorax	10 (11)
PAAL > 5 days, n (%)	16 (18)
Fistula, n (%)	1 (1)
Recurrent paralysis, n (%)	3 (3)
Surgical reoperation after D3, n (%)	3 (3)
Respiratory complications	
ARDS, n (%)	6 (7)
Atelectasis, n (%)	6 (7)
Pneumonia, n (%)	5 (5)
Oxygen therapy, n (%)	
Day 1	40 (44)
Day 2	20 (22)
Day 3	12 (13)
High-flow nasal cannula therapy, n (%)	6 (7)
Non invasive facial mask ventilation	5 (5)
Cardiac complications	
Postoperative vasoplegia requiring vasopressor therapy	3 (3)
Atrial fibrillation	8 (9)
Other complications	
Acute Renal failure (KDIGO \geq 1)	8 (9)
Death during the first 30 days, n (%)	0 (0)

Table 4. Comparison between the “Preserved “ and “Altered” RV strain groups for the risk of postoperative complications. Odds Ratio with 95% confidence interval (CI).

Postoperative complication	Odds Ratio (95% CI)	<i>P</i> value
Pulmonary hypertension	0.3 (0.1 — 1.7)	0.17
Pneumothorax	7.9 (0.9 — 70.0)	0.06
PAAL	1.1 (0.3 — 4.3)	0.90
Atelectasis	2.2 (0.2 — 26.0)	0.52
Pneumonia	1.1 (0.1 — 8.2)	0.94
Atrial Fibrillation	4.8 (0.5 — 46.0)	0.17
Acute renal failure KDIGO \geq 1	3.7 (0.4 — 37.5)	0.28
Unplanned ICU admission	1.1 (0.2 — 7.9)	0.97

PAAL : prolonged alveolar air leak ; KDIGO : kidney disease improving global outcomes ; ICU : intensive care unit.

Table 5. Preoperative risk factors for developing an “altered” RVLW longitudinal in the early postoperative period after major lung resection surgery. Odds Ratio with 95% confidence interval (CI).

Preoperative parameter	Odds Ratio (95% CI)	<i>P</i> value
Male sex	0.9 (0.3 — 2.5)	0.82
Thoracotomy	1.3 (0.5 — 3.7)	0.63
Right side procedure	1.1 (0.4 — 3.2)	0.82
COPD	0.6 (0.2 — 1.6)	0.27
Emphysema	0.4 (0.2 — 1.3)	0.13
Coronary disease	0.3 (0.1 — 1.7)	0.17
Bilobectomy or pneumonectomy	3.2 (0.6 — 17.6)	0.17

COPD : chronic obstructive pulmonary disease

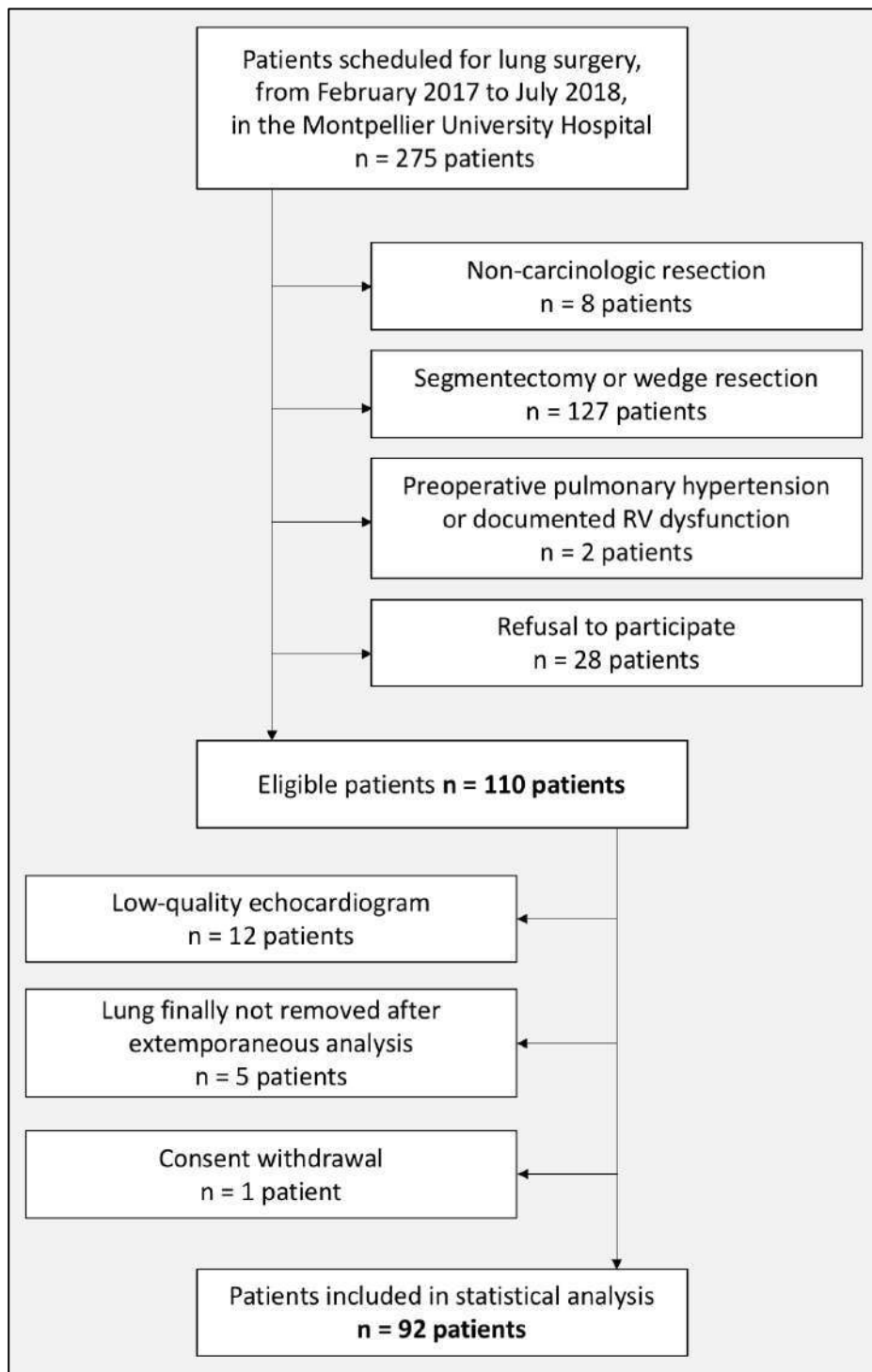
Figure 1. Study Flow Chart.

Figure 2. Evolution of the right ventricle lateral wall (RVLW) longitudinal strain (A), and its apical, middle and basal segments (B), in the study population from baseline (D0) to the postoperative days 1, 2, and 3 (D1, D2, D3 respectively). Mean \pm SD and min to max plots. *P* value for the mixed model (time effect).

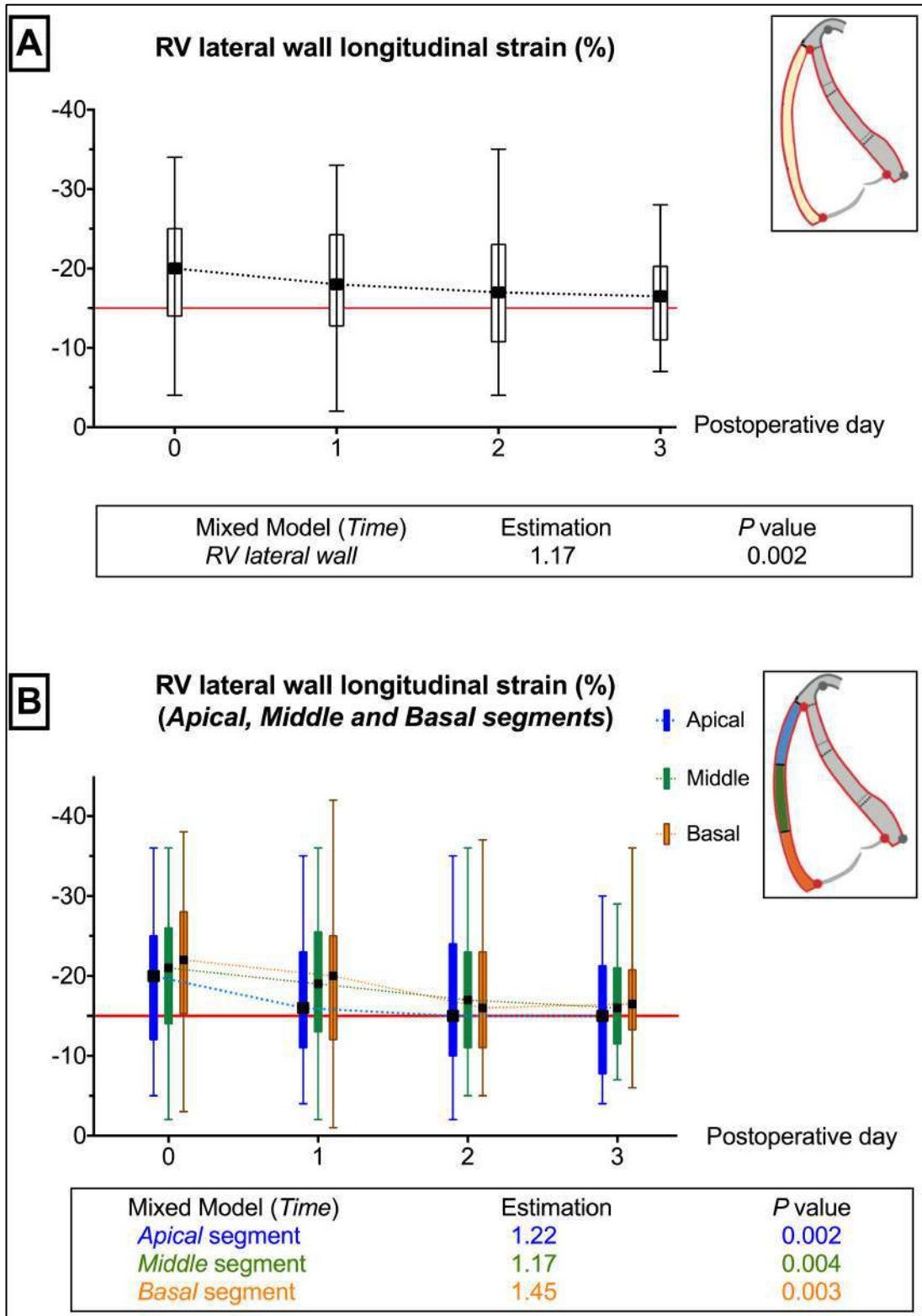
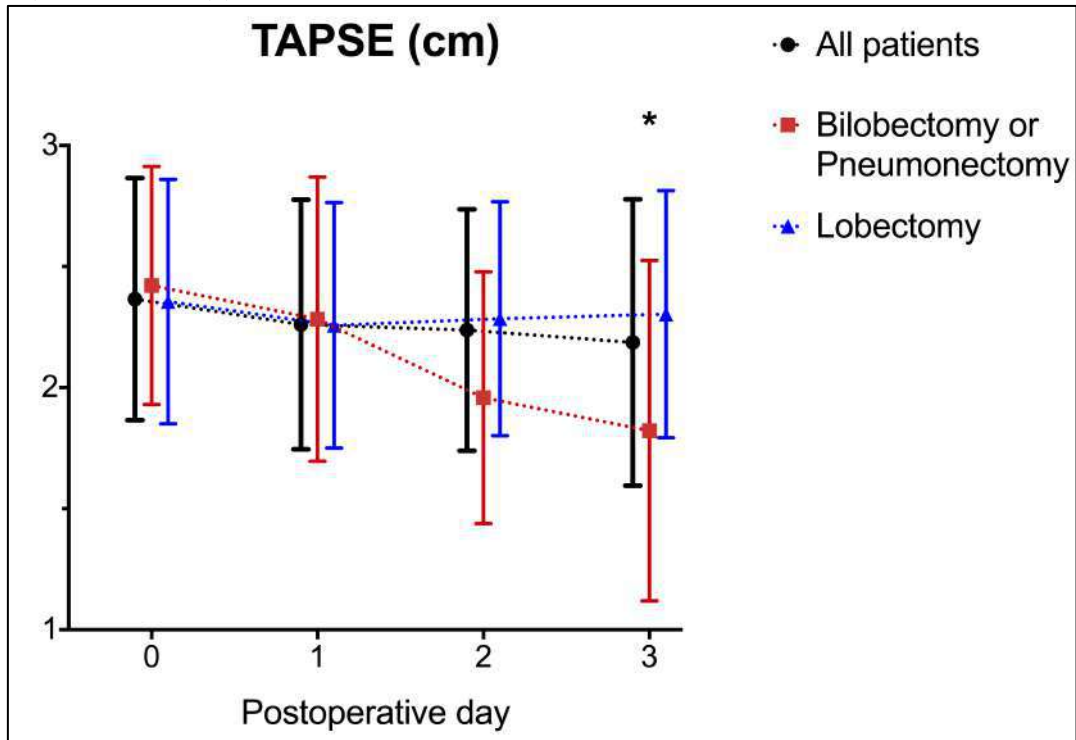
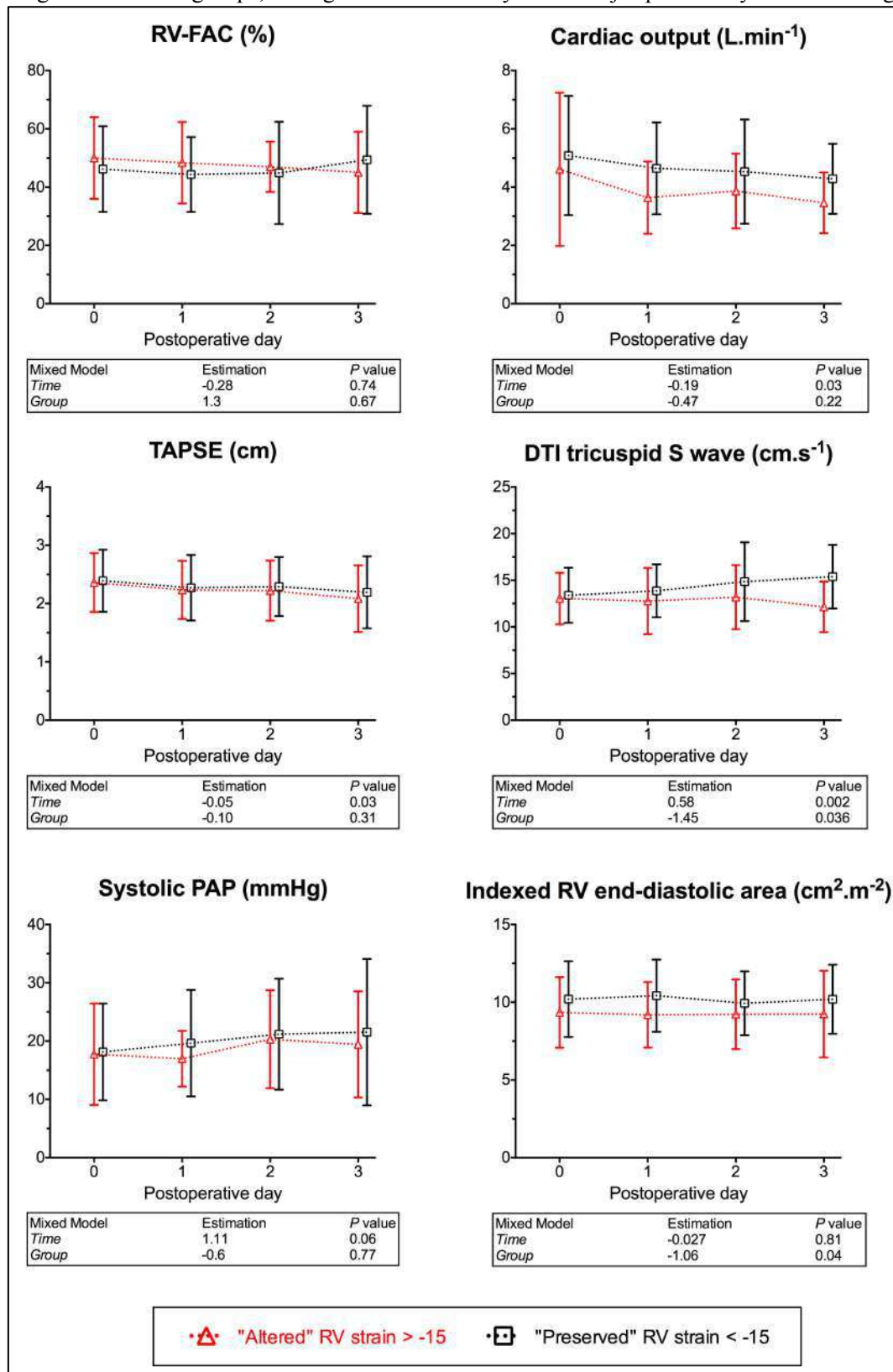


Figure 3. Postoperative values of the tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) in all patients (black) divided into two subgroups: the lobectomy group (purple) and the bilobectomy or pneumonectomy group (red). Mean \pm SD. (*) : T test $P < 0.05$.



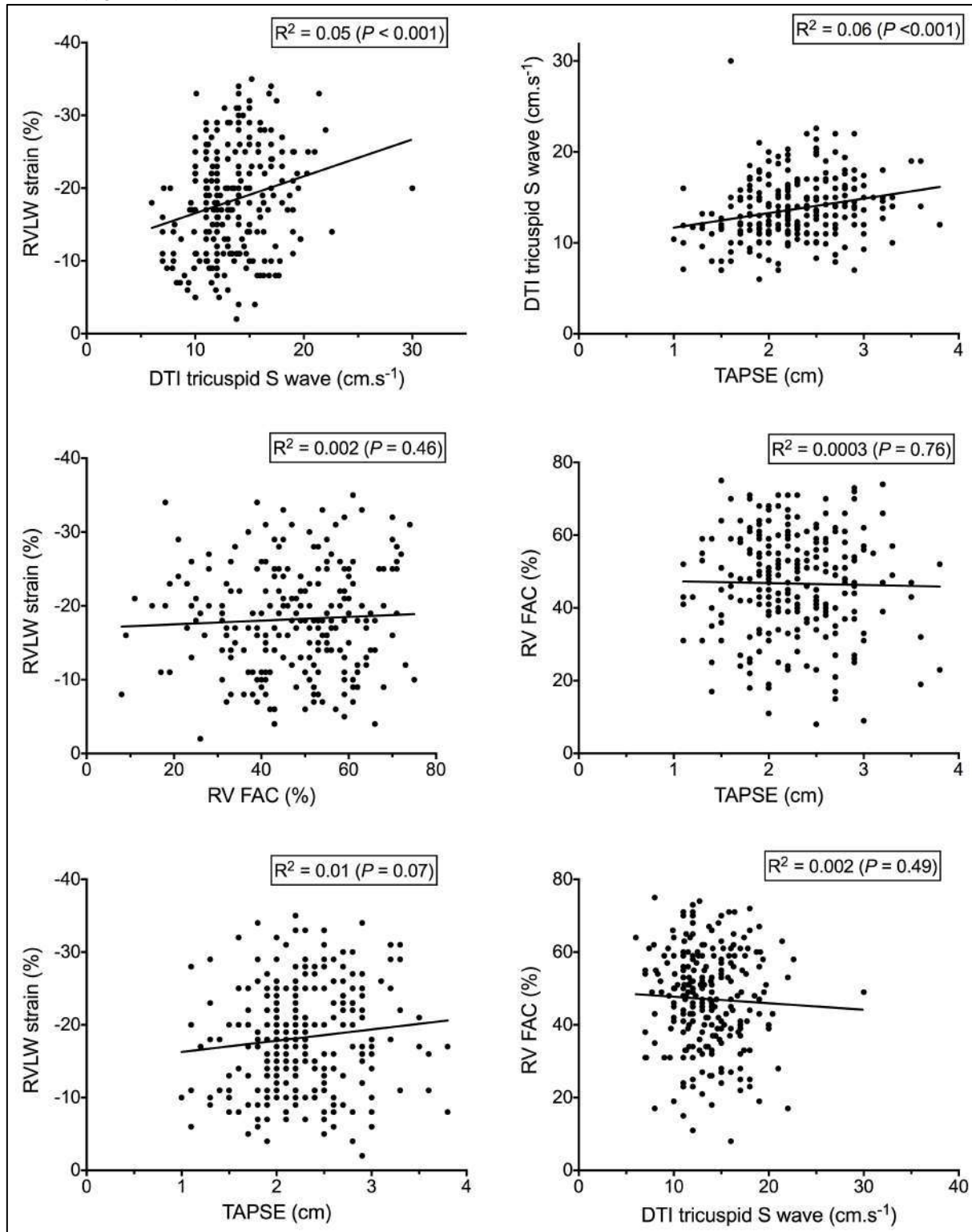
TAPSE : tricuspid annular plane systolic excursion.

Figure 4. Comparison of the RV parameters between the « altered » (in red) and « preserved » (in black) RVLW longitudinal strain groups, during the first three days after major pulmonary resection surgery.



RV-FAC : Right ventricle fractional area change ; TAPSE : Tricuspid annular plane systolic excursion ; PAP : pulmonary arterial pressure ; DTI : Doppler tissular imaging.

Figure 5. Linear regression of the RVLW longitudinal strain with the other RV systolic parameters (left side), and linear regression between the other RV systolic parameters: TAPSE, DTI tricuspid S wave and RV-FAC (right side).



RV-FAC : Right ventricle fractional area change ; TAPSE : Tricuspid annular plane systolic excursion ; PAP : pulmonary arterial pressure ; DTI : Doppler tissular imaging ; RVLW : RV lateral wall.

V. DISCUSSION

PLAN

V. 1. PARTIE EXPERIMENTALE	167
V. 1. 1. Principaux résultats et revue de la littérature.....	167
V. 1. 2. Limites de l'étude animale et pistes d'amélioration	173
V. 2. PARTIE CLINIQUE	175
V. 2. 1. Rappel des principaux résultats et revue de la littérature	175
V. 2. 2. Conclusion et perspectives.....	178

V. 1. PARTIE EXPERIMENTALE

Nous avons mis au point un modèle de pneumectomie droite chez le rat, qui associait de façon cohérente une hypertension pulmonaire et un remodelage du cœur droit.

V. 1. 1. Principaux résultats et revue de la littérature

V. 1. 1. Une hypertension pulmonaire modérée a priori non réversible

Dans cette étude, les rats ayant subi une pneumectomie développaient une hypertension pulmonaire, précoce et de gravité modérée avec une PAPm qui s'élevait en moyenne à 35 mmHg et une PAP systolique à 55 mmHg quatre semaines après l'intervention [120]. Nous avons ajouté une évaluation à deux mois de la chirurgie, qui retrouvait une HTP persistante, sans aggravation significative du niveau de PAP entre D28 et D56. Nos résultats diffèrent quelque peu de ceux déjà publiés sur le sujet.

Dans l'étude de Zhu *et al.*, la plus proche de la notre sur le plan méthodologique, les auteurs retrouvaient aussi une élévation progressive de la PAPm sur les six premières semaines après pneumectomie droite chez le rat, mais les valeurs de PAPm étaient moins élevées avec une valeur de base à 12.2 ± 1.4 et un maximum de 22.3 ± 2.1 mmHg à 6 semaines [33]. Cette étude ne disposait pas d'un groupe sham et les résultats concernant la pression systémique n'étaient pas publiés (une pression systémique basse au moment du cathétérisme peut faussement diminuer la mesure de pression artérielle pulmonaire).

Après pneumectomie gauche chez le porc, Berthet *et al.* retrouvaient une élévation plus sévère et plus précoce de la PAPm à 40 mmHg dès J2 [1] ; mais la pression se normalisait à J7, signant une maladie réversible, ce qui n'a pas été le cas dans notre étude. Cette étude sur le porc avait quelques limites, le volume de parenchyme réséqué dans la pneumectomie gauche est inférieur par rapport à la droite, et les animaux contrôles n'étaient pas suivis dans le temps.

Chez l'homme, après pneumectomie droite, Foroulis *et al.* retrouvaient des chiffres de PAP systolique similaires à ceux retrouvés dans notre modèle expérimental, en moyenne 48 ± 10 mmHg à 6 mois de la chirurgie [37], signant bien le caractère non réversible de la maladie.

Dans notre modèle, la pression de l'oreillette droite ne s'élevait pas de façon significative chez les rats PN. En effet, le maintien d'une bonne fonction systolique VD a probablement permis que la POD ne s'élève pas, alors même que l'oreillette droite se dilatait. L'élévation de la POD est un signe de sévérité dans cette maladie, car son élévation peut diminuer le débit cardiaque en diminuant le retour veineux systémique.

V. 1. 2. Un remodelage sélectif du VD de type dilatation-hypertrophie

Dans notre étude, l'hypertension pulmonaire entraînait une augmentation de post-charge et un remodelage du cœur droit, avec dilatation et hypertrophie du ventricule droit, dilatation de l'oreillette droite, dilatation de l'artère pulmonaire, avec probablement une dysfonction diastolique débutante à droite. Dans notre modèle, les dimensions du VD, de l'OD, le rapport VD/VG et l'épaisseur de la paroi latérale du VD ont été multipliés approximativement par un facteur deux entre D0 et D28 chez les rats PN. Le remodelage était sélectif pour le VD, l'épaisseur de la paroi antérieure et postérieure du VG était constante. Le rapport VD/VG en surface était supérieur à 1 chez les PN à D28, signant une dilatation sévère. Ce remodelage échographique du VD était confirmé par le « gold standard » à savoir l'indice de Fulton (RVHI) qui doublait entre D0 et D28 chez les rats PN. Nous avons aussi constaté que l'hypertrophie du VD était associée à une fibrose à la fois périvasculaire et interstitielle.

Ces résultats sont cohérents avec les études précédentes. Dans une étude chez le chien, Kocatürk *et al.* retrouvaient aussi une dilatation progressive de l'OD, du VD et de l'artère pulmonaire dans les 30 jours qui suivaient la pneumectomie, avec une PAP systolique qui s'élevait à 56 ± 4 mmHg, alors qu'aucun remodelage du cœur droit n'apparaissait après lobectomie [26]. Les auteurs de ce travail retrouvaient une diminution significative du rapport E/A tricuspide qui apparaissait à J30 tout en restant supérieur à 1. Dans notre étude le rapport E/tAt s'inversait à D28 dans le groupe PN, mais cette différence n'était pas significative. La dysfonction diastolique est la conséquence logique du remodelage du cœur droit, mais nous n'avons pu formellement la mettre en évidence dans notre étude, probablement du fait d'un manque de puissance. Il est probable que l'ajout du Doppler tissulaire (DTI) aurait pu aider à la caractérisation de la dysfonction diastolique.

V. 1. 3. Une fonction systolique VD préservée

La fonction systolique du VD était préservée alors que l'on observait une diminution modeste de la fonction systolique VG chez les rats pneumectomisés. Un résultat que nous n'avons pas publié, la variabilité respiratoire du volume d'éjection systolique (VES) évaluée par le Delta-ITV était augmentée chez les PN, un équivalent de « pouls paradoxal », en analogie avec ce que l'on peut observer dans l'embolie pulmonaire.

Les indices de fonction systolique du VD que sont le TAPSE et la fraction de raccourcissement de surface (RVFAC) n'étaient pas modifiés après pneumonectomie. On observait cependant une augmentation du TAPSE dans le groupe PN à D28. Cette différence était probablement le simple reflet de la dilatation des cavités droites qui augmentait mécaniquement le déplacement de l'anneau tricuspide. Le strain étant souvent un marqueur plus précoce que les autres indices de fonction systolique du VD, on peut supposer qu'une évaluation du 2D-strain longitudinal du VD aurait permis d'améliorer la caractérisation de la fonction systolique dans notre modèle.

Chez l'homme, Kowalewski *et al.* retrouvaient en échographie une diminution de la fraction d'éjection du VD entre J0 et J2 après pneumectomie, de 48 ± 5 à $39 \pm 4\%$, alors que celle-ci n'était pas modifiée après lobectomie. Ces résultats sont issus d'évaluations échographiques et n'ont pas été confirmés par un examen de référence comme l'IRM cardiaque. En effet, on sait que l'évaluation échographique de la fonction systolique du VD est difficile (c'est pour cela qu'elle utilise des indices), particulièrement après une résection pulmonaire.

Elrakhawi *et al.* ont confirmé ces résultats par cathétérisme artériel pulmonaire chez 142 patients opérés de lobectomie et 36 patients opérés d'une pneumonectomie, suivis pendant 48 heures après la chirurgie [63]. La PAPm à J2 était élevée dans les deux groupes, à 25 ± 7 et 33 ± 6 mmHg respectivement, et était associée à une diminution de RVEF à 42 ± 8 et 37 ± 9 % et une dilatation du VD dans les deux groupes, plus importante après pneumonectomie.

Dans l'étude récemment publiée en 2019 par McCall *et al.* [41], une évaluation par IRM cardiaque était réalisée avant puis deux jours et deux mois après résection pulmonaire. Même si la population de cette étude était constituée principalement de patients opérés d'une lobectomie ($n = 23$ lobectomie, $n = 4$ bilobectomie, $n = 1$ pneumonectomie), les auteurs ont montré une diminution de RVEF de 51 ± 7 à $46 \pm 6\%$ deux mois après la résection, associée à une dilatation du VD aux dépens du VG (avec respectivement une augmentation du RVEDV et diminution du LVEDV à 2 mois). Dans cette étude, la dilatation des cavités droites n'avait pas de retentissement sur la fonction systolique à gauche.

Dans notre modèle, nous avons observé une diminution de la fonction systolique du VG à D7 et D28, accompagnée d'une diminution du VES et du débit aortique à D3 et D7 dans le groupe PN, avec récupération d'un débit normal à D28. Elle s'explique probablement par la croissance du VD qui « gêne » le VG de par l'interdépendance VD-VG au sein d'un péricarde inextensible. S'agissant du rat, nous n'avons pas pu raisonnablement indexer les valeurs de VES ou de débit cardiaque à la surface corporelle. Or, les rats PN à D7 étaient bien moins gros que les sham à D7 (probablement en lien avec un syndrome inflammatoire plus élevé et une récupération post-opératoire plus lente chez les PN). Cette nette différence de poids peut expliquer à elle seule la différence de débit cardiaque observé.

Chez l'homme, du fait de l'interdépendance VD-VG, il est bien admis qu'une dilatation ou un remodelage important du VD peuvent altérer la fonction cardiaque gauche [64]. Les données de la littérature concernant le retentissement gauche de la dysfonction droite sont plus contrastées. Dans l'étude de Kowalewski *et al.*, le VES indexé était préservé après pneumectomie [61]. Dans l'étude de Wang *et al.* publiée en 2015, la fraction d'éjection du VG était légèrement diminuée après résection pulmonaire majeure, mais restait dans des valeurs normales [65]. L'étude d'Okada *et al.*, ne retrouvait pas de dysfonction gauche après résection pulmonaire, ni au repos, ni même à l'effort [40]. Dans notre étude RESECHO [3], durant les trois premiers jours après résection pulmonaire majeure, nous avons trouvé une diminution significative du débit cardiaque, sans dysfonction systolique gauche associée.

V. 1. 4. Un œdème pulmonaire non cardiogénique, précoce et transitoire

Dans notre modèle, un œdème pulmonaire précoce a été mis en évidence par une élévation du Wet/Dry Ratio à D3 chez les rats ayant subi une pneumectomie. L'œdème était transitoire puisqu'il n'était plus significatif à D7, et disparaissait complètement à D28. Ce résultat est plutôt cohérent avec les études antérieures.

Dans leur étude chez le cochon, Berthet *et al.*[1] retrouvaient un œdème pulmonaire à D3 et D7 après pneumectomie gauche. Dans leur étude chez le chien, Little *et al.* ont montré que l'œdème pulmonaire était encore plus précoce et pouvait survenir dans l'heure suivant la pneumectomie, avec un *Wet/Dry* ratio qui s'élevait au-dessus de 6 [27].

Chez l'homme, deux études ont montré qu'un œdème pulmonaire survenait dans les 3 à 7 premiers jours après chirurgie thoracique [124,125]. Cet œdème pulmonaire post-pneumectomie aurait une incidence d'environ 10 à 15% selon les études avec une mortalité variable entre 10 et 100% selon les séries [125,126].

Sur le plan physiopathologique, cet œdème serait le résultat de l'augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire, liée d'une part à une surdistension alvéolaire en ventilation uni-pulmonaire (même si notre ventilation était protectrice), et surtout à un hyperdébit dans le réseau vasculaire du poumon restant, avec une altération des jonctions entre les cellules endothéliales à ce niveau. Les facteurs de risque « extrinsèques » décrits chez l'homme et l'animal sont un remplissage vasculaire péri-opératoire excessif [127], les lésions induites par la ventilation mécanique, les lésions lymphatiques [27] et la dysfonction systolique du VD, qui, en augmentant la pression veineuse centrale, diminue le drainage lymphatique thoracique [128].

Dans notre modèle, l'œdème pulmonaire précoce que nous avons observé était indépendant de tout facteur de risque surajouté, puisque notre ventilation mécanique était protectrice et qu'aucune dysfonction VD n'a été constatée. Cet œdème était bien non cardiogénique, puisque les pressions de remplissage n'étaient pas élevées à gauche. Seulement, il nous manquait dans notre modèle une évaluation de la pression capillaire pulmonaire par mesure de la pression artérielle pulmonaire occluse. L'œdème pulmonaire que nous avons constaté était donc bien exclusivement et « intrinsèquement » lié à la résection pulmonaire et l'hyperdébit.

Un retentissement minime de l'œdème sur l'hématose a pu être mis en évidence à D7. En effet, la PaO₂ et la SaO₂ étaient comparables mais légèrement inférieurs à D7 chez les rats PN. Il n'y avait plus d'œdème significatif à D28, comme si l'œdème initial s'était résorbé, ou comme si les facteurs responsables avaient disparu. Notre hypothèse est qu'après un certain délai, un nouvel équilibre est atteint entre l'hyperdébit dans le réseau vasculaire pulmonaire restant et la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire.

V. 1. 5. Mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'HTP

Dans notre modèle, l'HTP n'était pas due à une vasoconstriction hypoxique. Les pressions étaient mesurées chez des rats ventilés, les paramètres d'oxygénation (PaO₂ et SaO₂) étaient conservés dans les deux groupes, excepté à D7 où nous avons constaté une légère baisse du niveau d'oxygénation chez les rats PN. A D28, la pression pulmonaire croît alors que les paramètres d'oxygénation sont tous égaux entre sham et PN, ce qui révèle bien que la vasoconstriction hypoxique n'explique pas l'HTP. D'autre part, nous avons constaté que l'hématocrite et le taux d'hémoglobine restaient constants chez les rats PN comme chez les sham, alors qu'ils sont censés augmenter en cas d'hypoxie chronique, attestant bien que les rats PN n'étaient pas hypoxiques.

Le remodelage vasculaire pulmonaire hypertrophique était le mécanisme prédominant. L'HTP était associée à une muscularisation des artères pulmonaires distales, qui commençait probablement dès D3, et aboutissait à une différence nette à D7 et D28. A ces stades, on retrouvait chez les rats PN une muscularisation compétente des vaisseaux pulmonaires au niveau distal où les artères sont normalement non muscularisées. Nous avons même mis en évidence sur certaines coupes des artérioles pseudo-occlusives témoignant d'un remodelage assez sévère.

Ces résultats sont relativement concordants avec la seule étude expérimentale publiée à ce jour sur le sujet [33]. Dans leur étude, Zhu *et al.* retrouvaient également une augmentation de la muscularisation des petites artères pulmonaires mais dans une moindre proportion, expliquant certainement pourquoi les pressions mesurées chez ces rats étaient plus basses que dans notre modèle.

La muscularisation des artères pulmonaires distales était due à une prolifération excessive des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires. L'étude immuno-histologique des coupes pulmonaires, a montré une augmentation de l'expression de PCNA dans les CML des petites artères pulmonaires. Cette surexpression de l'antigène PCNA signe un excès de prolifération des CML, résultat d'un déséquilibre de la balance prolifération / apoptose et aboutissant à un épaississement des petites artères pulmonaires.

La prolifération des CML était sous contrôle paracrine des cellules endothéliales pulmonaires. Le « cross talk » entre cellules endothéliales pulmonaires et CML est déjà bien décrit dans d'autres modèles d'HTP [42,45]. Dans notre modèle de *shear stress* sur cellules humaines, nous avons montré que l'étirement cyclique pathologique sur les cellules endothéliales induisait la synthèse de facteurs de croissance conduisant à une prolifération excessive des CML. L'application « directe » de l'étirement cyclique pathologique sur les CML n'induisait pas de modification supplémentaire de prolifération. Les cellules endothéliales pulmonaires semblent bien être le « *sensor* » de l'hyperdébit, et la muscularisation des CML n'est qu'une réponse « normale » à ce mécanisme lésionnel.

Le remodelage vasculaire pulmonaire était associé à une augmentation de l'expression de l'antigène CD68, révélant une infiltration de monocytes - macrophages dans les poumons des rats PN, renforçant l'hypothèse selon laquelle la maladie est associée à une réponse inflammatoire exagérée. Ce résultat est en accord avec

l'étude de Zhu *et al.* [33], qui retrouvait une augmentation significative de l'expression du TGF- β à J7 et J14 post-pneumectomie, ainsi qu'une augmentation de l'expression de CTGF à J28.

L'angiogénèse pulmonaire est probablement protectrice dans cette pathologie. La présence de plus de cellules CD31+ dans le poumon de rats PN à D28 laisse supposer la mise en place d'un processus angiogénique sûrement dû à une induction de l'expression de facteurs angiogéniques en réponse à l'hypoxie ou à l'hyperdébit. Ce phénomène de néoangiogénèse a été également observé dans le modèle d'HTP secondaire à l'hypoxie chronique chez le rat et semblait avoir un effet protecteur [129,130], expliquant pourquoi l'HTP est rarement sévère dans ce modèle.

V. 1. 6. La mutation hétérozygote pour le gène *BMPR2* ne semble pas être un facteur d'aggravation

La mutation *BMPR2* est la première cause d'HTAP « héritable » chez l'homme, même si la pénétrance est incomplète. Les patients porteurs d'une mutation *BMPR2* peuvent ne pas présenter d'HTAP. Ceux développant une HTAP ont souvent une maladie plus sévère et plus précoce que dans les formes « non héritables ». Chez des rats porteurs de la mutation *BMPR2*+/- Δ 71, souche développé par Hautefort *et al.* [114], l'HTP liée à la monocrotaline ou à l'hypoxie chronique était plus sévère que chez les rats de souche « sauvage ». Même si nos expériences avaient débuté avant que les résultats de l'équipe de Marie Lannelongue ne nous soient dévoilés, notre hypothèse était que le phénotype observé après pneumonectomie pouvait être plus sévère chez les rats porteurs de la mutation. Nous n'avons pas trouvé le résultat escompté, puisque l'HTP post-pneumonectomie et le remodelage cardiaque étaient identiques chez les rats « mutés » et « sauvages ». Nos résultats, discordants avec la littérature, doivent cependant être validés par une seconde étude sur le sujet.

V. 1. 7. Le pré-conditionnement pulmonaire est délétère

Dans notre étude, le pré-conditionnement pulmonaire induisait une surmortalité chez les rats ayant subi une pneumectomie. Deux possibilités, soit le PPC est réellement délétère, soit il a été mal administré.

S'agissant de la première étude sur le sujet, il était très difficile pour nous de déterminer la « dose » de pré-conditionnement à administrer. Elle a donc été définie arbitrairement, en se calquant sur les durées de pré-conditionnement cardiaque par ligature coronaire. Considérant que le PPC induisait du bas débit cardiaque par le phénomène d'ischémie-reperfusion, nous avons ensuite essayé de réduire la « dose », sans succès. Le pré-conditionnement ischémique « *remote* », réalisé à distance de la zone opérée, est probablement moins délétère [82] et devrait être exploré chez l'homme dans de prochaines études [80].

V. 1. 8. Un antagoniste sélectif du récepteur *PDGFR*-béta comme piste thérapeutique ciblée

Nous avons montré que le couple PDGF-B / PDGFR-béta jouait un rôle clé dans l'HTAP chez l'homme. Les patients atteints d'HTAP avaient une surexpression du récepteur PDGFR-béta à la surface des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires. L'effet du PDGF-B sur ce récepteur induisait une prolifération excessive des CML. Les CML issues de patients HTAP étaient plus « sensibles » à cette stimulation par PDGF-B et répondaient par une croissance plus importante que les CML des sujets sains.

La synthèse d'un antagoniste compétitif du récepteur PDGFR-béta, nommé inhibiteur A4, préalablement validé *in vitro*, a permis de diminuer la PAP et le remodelage hypertrophique du ventricule droit dans deux modèles d'HTAP, le modèle monocrotaline, et l'HTP post-pneumectomie. Cette diminution de PAP était associée à une diminution de la musculation des artères pulmonaires de petit calibre.

Nos résultats sont cohérents avec les données de la littérature. Il est bien décrit que le « *shear stress* » influe de façon privilégiée sur l'expression du PDGF et de son récepteur PDGF-R β pour induire la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires [98–102,28]. Dans l'étude de Sage *et al.*, l'expression du PDGF était augmentée dans le poumon controlatéral après pneumectomie droite chez le cochon, et encore plus élevée après ligature de l'artère pulmonaire droite [28]. De plus, dans la séquence du promoteur du PDGF-B, à l'extrémité cis, il y a un facteur de transcription qui s'active lorsque la cellule est soumise au *shear stress* [99,103], le « *cis-acting fluid shear-stress-responsive element* ».

L'Imatinib (STI571 ou Glivec®), un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase, non sélectif de la voie PDGF, était une piste thérapeutique prometteuse dans les modèles expérimentaux d'HTAP [104,105]. Seulement, son utilisation dans l'HTAP chez l'homme (étude IMPRESS) a montré que ce médicament pouvait être délétère [107,108]. Il est probable qu'un inhibiteur sélectif du PDGFR-béta soit aussi efficace que l'Imatinib sur le remodelage vasculaire pulmonaire tout en ayant moins d'effets indésirables. Cependant, les étapes de développement d'un tel médicament sont nombreuses avant qu'il puisse être testé chez l'homme dans l'HTAP idiopathique ou après pneumectomie.

V. 1. 2. Limites de l'étude animale et pistes d'amélioration

Alors que c'était un résultat attendu, avec les outils d'évaluation dont nous disposions, nous n'avons pas pu mettre formellement en évidence de dysfonction diastolique après pneumectomie. Au vu de la sévérité du remodelage hypertrophique du VD, nous nous attendions à voir une dysfonction diastolique à D28. Le rapport E/A tricuspide était inversé chez les rats PN, mais sans être significativement différent des sham. Nous manquons possiblement de puissance pour mettre en évidence une différence sur ce paramètre. Aussi, la fonction doppler tissulaire (DTI) nous aurait permis une évaluation plus fine de la fonction diastolique droite et gauche. De même, tout comme le *strain* de l'oreillette gauche est maintenant un outil diagnostique validé dans la dysfonction diastolique gauche [131], nous aurions pu étudier les variations du *strain* de l'oreillette droite après pneumectomie.

Enfin, nous aurions pu améliorer la caractérisation du modèle en y intégrant d'autres outils d'évaluation. La pléthysmographie nous aurait permis d'étudier l'adaptation fonctionnelle respiratoire après pneumectomie. L'IRM cardiaque est le « *gold standard* » pour l'évaluation des volumes cardiaques, de la fonction systolique, de la fibrose, et aurait amélioré l'étude du VD après pneumectomie. De même, la réalisation de boucles Pression-Volume avec des cathéters spécifiques aurait permis de mieux caractériser la fonction systolique du VD.

L'ensemble de ces pistes d'amélioration faisait parti d'un projet d'étude à part entière (cf. partie III. 1. 3. ETUDE E3) et sont décrites dans la partie Méthodes.

V. 2. PARTIE CLINIQUE

V. 2. 1. Rappel des principaux résultats et revue de la littérature

V. 2. 1. 1. Principaux résultats de l'étude « RESECHO »

Dans notre cohorte de patients opérés d'une résection pulmonaire, le suivi postopératoire était réalisé jusqu'au 3^{ème} jour postopératoire, qui correspond le plus souvent à la sortie d'hospitalisation pour les patients admis dans un programme de réhabilitation accélérée. Les patients bénéficiaient d'une échocardiographie préopératoire puis quotidienne pendant 3 jours. Durant cette période postopératoire précoce, nous avons observé une altération du 2D *strain* longitudinal de la paroi libre du VD chez 55% des patients. L'altération du *strain* était homogène sur l'ensemble de la paroi latérale (segments basal, moyen et apical). Les autres marqueurs de fonction systolique s'altéraient moins fréquemment. Le TAPSE s'est altéré chez 15% des patients, préférentiellement après pneumonectomie ou bilobectomie qu'après lobectomie. L'onde S à l'anneau tricuspide et la fraction de raccourcissement de surface (RV-FAC) n'étaient pas modifiées de manière significative. Une HTP survenait chez 11% des patients. La PAPS augmentait modestement de 2 mmHg. Le seul paramètre corrélé avec le *strain* de la paroi latérale était l'onde S à l'anneau tricuspide. Nous n'avons pas mis en évidence de facteurs de risque ni de complications postopératoires associées à un RVLW *strain* altéré.

V. 2. 1. 2. L'hypertension pulmonaire après résection pulmonaire

La morbidité après résection pulmonaire est importante, et la mortalité reste élevée après pneumonectomie. L'HTP et la dysfonction VD sont des complications qui grèvent le pronostic postopératoire et peuvent altérer la qualité de vie. L'HTP après pneumonectomie est inconstante, le plus souvent modérée [34], et dépendrait principalement des antécédents cardio-respiratoires du patient et du volume pulmonaire réséqué. Dans les études précédents, l'HTP était plus marquée après pneumonectomie [34,37] qu'après lobectomie, et les formes les plus sévères étaient observées après pneumonectomie droite. Un âge avancé, une capacité vitale préopératoire réduite et une hypoxémie postopératoire étaient des facteurs prédisposant pour le développement d'une HTP postopératoire. Il est probable que l'HTP post-pneumonectomie soit déclenchée ou majorée par un « *second hit* » survenant dans la période postopératoire, comme une complication pulmonaire sur le poumon restant pourvoyeuse d'hypoxémie

V. 2. 1. 3. L'altération des indices « classiques » de fonction systolique VD après résection pulmonaire

L'HTP est donc inconstante, peut rester asymptomatique, ou bien être associée à des complications cardiovasculaires, comme la dysfonction VD ou l'arythmie cardiaque. Effectivement, le retentissement sur la fonction VD des résections pulmonaires majeures est variable dans la littérature, même si la plupart des

auteurs concluent à une altération de la fonction VD après résection pulmonaire majeure. On peut catégoriser les études précédents en fonction du temps d'évaluation cardiaque, à court, moyen, ou long terme après la chirurgie. Les études de Foroulis et Potaris retrouvaient une dysfonction VD à long terme, 6 mois et 12 mois après pneumonectomie [34,37]. Ces altérations se prolongeaient jusqu'à 4 ans après la chirurgie dans l'étude de Venuta *et al.* [62]. Plus récemment, dans l'étude de McCall *et al.*, l'IRM cardiaque retrouvait une diminution de fraction d'éjection VD et une dilatation VD deux mois après la chirurgie (principalement lobectomie) [41]. Dans la période postopératoire précoce, les études sont moins nombreuses et les résultats plus contrastés. En échographie, Kowalewski *et al.* retrouvaient une dysfonction VD précoce, à J2 de la pneumonectomie, avec dilatation VD et baisse de la fraction d'éjection. Ces résultats ont été confirmés par cathétérisme artériel pulmonaire à J2 dans l'étude d'Elrakhawi *et al.* [63]. Dans notre étude, une altération précoce de la fonction VD était observée mais les modifications des paramètres étaient discrètes. Il est probable que les indices « classiques » de fonction VD, comme le TAPSE, l'onde S tricuspide ou le RV-FAC, manquent de sensibilité et de spécificité en postopératoire précoce.

En effet, la plupart des études échographiques sur la dysfonction VD sont limitées par le fait que la plupart des paramètres échocardiographiques de fonction VD ne sont pas parfaits et présentent de nombreuses limites (cf. paragraphe I. 4. 1. Les outils d'évaluation de la fonction cardiaque droite). La plupart ne donnent qu'une évaluation « segmentaire », tronquée, de la contractilité du VD. L'onde S et le TAPSE sont des paramètres validés et recommandés dans l'évaluation de la fonction systolique VD [132], mais n'évaluent que le mouvement du VD à l'anneau tricuspide.. Le 2D *strain* longitudinal du VD, un paramètre plus récent, évalue la contractilité de l'ensemble du VD, ou de la paroi latérale, et permet d'améliorer l'évaluation de la fonction cardiaque droite.

V. 2. 1. 4. L'altération du 2D- strain longitudinal du VD après résection pulmonaire

V. 2. 1. 4. 1. Intérêt du 2D strain longitudinal du VD dans d'autres maladies cardiovasculaires

La mesure du 2D strain longitudinal du VD est basée sur le « *speckle-tracking* », calculée par un logiciel à partir de la coupe apicale quatre cavités en échocardiographique. Cet indice semble être un bon indicateur de fonction systolique, souvent plus précoce que les indices classiques. Bien qu'il soit principalement recommandé pour l'évaluation de la fonction systolique du VG [133], son utilisation pour l'étude de la fonction VD est de plus en plus développée. Par exemple, dans l'amylose cardiaque, Santos *et al.* ont montré que le strain longitudinal du VD identifiait les segments les plus altérés [134]. Dans cette étude, le *strain* VD était meilleur que le TAPSE ou l'onde S pour dépister la dysfonction systolique. Autres exemples, le strain VD a également sa place dans le diagnostic des atteintes cardiaques dans les maladies de système [135], ou dans le suivi de la cardiotoxicité des chimiothérapies [136]. Enfin, dans le SDRA, une équipe a suggéré que le strain VD était le meilleur paramètre pour le diagnostic de dysfonction VD [137].

V. 2. 1. 4. 1. Intérêt du 2D strain longitudinal après chirurgie de résection pulmonaire

Au moment de la rédaction du protocole RESECHO en 2015, aucune étude n'avait encore évalué l'altération du *strain* longitudinal du VD après résection pulmonaire. Depuis, seulement deux études sont parues sur ce sujet.

La première étude sur le sujet est publiée par Wang *et al.* en 2016. Le RVLW *strain* diminuait de $-31 \pm 6\%$ en préopératoire à $-12 \pm 4\%$ en postopératoire après pneumonectomie, et de $-30 \pm 6\%$ à $-18 \pm 8\%$ après lobectomie [65]. Le *strain* global du VD suivait la même évolution, de même que les *strain* radial et circonférentiel qui n'ont pas été étudiés dans notre étude. Le second article est publié en 2017 par Bhat *et al.* [72]. Dans cette étude portant principalement sur des patients opérés d'une lobectomie, le *strain* global du VD s'altérait en postopératoire, passant de -19 ± 5 à $-15 \pm 4\%$ à J2, et restait altéré à J7 et J30, sans différence entre lobectomie et pneumonectomie. Ces données nous semblent insuffisantes pour statuer sur l'intérêt du *strain* VD après chirurgie pulmonaire. En effet, dans ces deux publications, le 2D-*strain* était étudié comme un paramètre échographique isolé, sans être corrélé aux autres indices de fonction systolique du VD, ni aux événements cliniques postopératoires.

Dans notre cohorte, l'altération du RVLW *longitudinal strain* concernait 55% des patients. La variation du RVLW *strain*, de $-20 \pm 7\%$ à $-16 \pm 6\%$, était plus modérée que dans l'étude de Wang *et al.* [65], et sensiblement identique aux variations observées dans l'étude de Bhat [72]. Chaque segment de la paroi latérale du VD était atteint (apical, médial, basal). L'altération des autres indices était moins fréquente, autour de 10-15%. Cette faible incidence d'altération des indices « classiques » pourrait s'expliquer par la modeste augmentation de PAP de 18 à 22 mmHg, qui pourraient être trop faibles pour augmenter réellement la post-charge du VD, comme en témoigne l'absence de dilatation VD dans notre cohorte. La majorité des patients étaient opérés d'une lobectomie, et nous supposons que cette résection n'était pas suffisante pour entraîner un « hyper-débit » franc et précoce. De plus, il est possible que notre fenêtre d'évaluation diagnostique ait été trop « précoce » pour mettre en évidence une altération des indices « classiques ». Cela revient à affirmer que le *strain* est plus précoce, et plus sensible à une faible augmentation de PAP que les autres indices de fonction systolique. Cela a été rapporté par Zhang *et al.* dans la cardiopathie du patient cirrhotique [138].

Pour ces raisons, le RVLW *strain* était mal corrélé aux autres indices de fonction systolique. Seule l'onde S tricuspide était modestement corrélée au RVLW *strain*. Nous ne sommes pas les premiers à décrire cette absence de corrélation. Dans l'HTP « congénitale », Kemal *et al.* ont décrit une corrélation négative entre le *strain* et les indices conventionnels [139]. Cette absence de corrélation ne remet pas en question la valeur diagnostique du *strain*, au contraire.

Les patients ayant présenté un RVLW *strain* altéré avaient « tendance » à développer davantage de fibrillation auriculaire ou d'insuffisance rénale aigüe postopératoire, même si nous n'avons pas atteint le degré de significativité sur ces critères, probablement en raison d'un manque de puissance statistique.

V. 2. 1. 5. Limites de l'étude

Notre étude présente certaines limites. Comme toute étude basée sur des mesures échographiques, il y a un risque d'erreurs de mesure liées à la géométrie complexe du VD, aux variations anatomiques interindividuelles, et au défaut d'échogénicité induit par l'emphysème sous-cutané postopératoire. En effet, nous avons exclu douze patients en raison d'un manque d'échogénicité, soit environ 10% de la cohorte. La variation inter-observateur a été réduite au minimum puisque les examens, pour chaque patient, étaient effectués par le même médecin. La variation intra-observateur n'a pas été évaluée.

Ensuite, nous savons que le *strain* longitudinal varie en fonction des conditions de charge [140]. Il pourrait être surestimé chez les patients « pré-charge dépendants » (volo-dépendants). Dans notre étude, le débit cardiaque était diminué d'environ 0.8 L.min⁻¹ en postopératoire. La diminution du débit cardiaque est probablement multifactorielle. La dysfonction VD est probablement impliquée, même si l'élévation de PAP était faible. L'hypovolémie postopératoire, ou encore la vasoplégie sont des facteurs qui ont pu interférer. La majorité des patients ont bénéficié d'une péridurale thoracique pour l'analgésie, ce qui a pu modifier la contractilité [141]. Le remplissage vasculaire était standardisé pendant et après la chirurgie. Aucun patient n'a développé d'insuffisance cardiaque gauche et la FEVG n'était pas modifiée. Ainsi, nous pensons que la baisse du débit cardiaque est due aux effets conjoints de la dysfonction VD et de la vasoplégie veineuse liée à la péridurale. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer la pré-charge dépendance du *strain* VD.

V. 2. 2. Conclusion et perspectives

Après résection pulmonaire, le RVLW *longitudinal strain* s'altérait précocement chez plus de la moitié des patients, alors que les indices « classiques » de fonction systolique VD étaient peu modifiés. Aucune conséquence clinique n'était observée dans le groupe « *strain* altéré », probablement en raison d'une faible augmentation de PAP. Le RVLW *longitudinal strain* semble intéressant comme un paramètre indépendant, sensible et précoce pour évaluer la dysfonction VD postopératoire après résection pulmonaire. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer la place de celui-ci dans le suivi postopératoire à long-terme après résection pulmonaire. Dans l'HTP, le symptôme principal est la dyspnée à l'effort. Nous supposons que la dysfonction VD pourrait être démasquée par l'effort, lorsque le débit cardiaque augmente, comme cela a été montré par Okada *et al.* [40]. Nous proposons de conduire une étude similaire, avec évaluation échocardiographique à l'effort comprenant une mesure du *strain* VD (cf. [Projet C2](#)).

VI. CONCLUSION

Notre modèle de pneumectomie droite chez le rat associait de façon cohérente une hypertension pulmonaire de sévérité modérée et un remodelage cardiaque hypertrophique sélectif du cœur droit. L'hypertension pulmonaire était en lien avec une musculation des artères pulmonaires distales et une prolifération excessive des cellules musculaires lisses. *In vitro*, l'exposition des cellules endothéliales humaines à un étirement cyclique mécanique pathologique, mimant le *shear stress* lié à l'hyperdébit, se traduisait par une augmentation de la synthèse de PDGF. Ces altérations de la fonction paracrine des cellules endothéliales pulmonaires induisaient une prolifération excessive des cellules musculaires lisses humaines. Un antagoniste sélectif du récepteur bêta du PDGF réduisait la pression artérielle pulmonaire après pneumectomie droite chez le rat, en diminuant le degré de musculation des artères pulmonaires distales, ce qui a diminué le remodelage hypertrophique du ventricule droit.

Chez l'homme, le *strain* longitudinal de la paroi libre du ventricule droit, un nouveau marqueur de fonction systolique du VD, s'altérait chez plus de la moitié des patients après chirurgie de résection pulmonaire majeure. Les autres indices de fonction systolique s'altéraient moins fréquemment que le *strain*, probablement du fait d'une faible variation de pression artérielle pulmonaire, et leurs valeurs n'étaient pas corrélées à celles du *strain*. Le *strain* longitudinal de la paroi libre du ventricule droit pourrait être un marqueur plus sensible et plus précoce de dysfonction ventriculaire droite après résection pulmonaire.

Nous aimerions conduire une étude sur la tolérance à l'effort après résection pulmonaire, de façon à évaluer le couple ventricule droit/circulation pulmonaire et son impact sur la capacité à l'exercice et la qualité de vie des patients.

LISTE DES ABBREVIATIONS

4C : coupe 4 cavités	DPG : gradient diastolique pulmonaire
<i>6MWT</i> : six minutes walking test	<i>DTI</i> : doppler tissue imaging
AAT : temps d'accélération aortique	EC : enzyme de conversion
AC : adénylate cyclase	ECG : électrocardiogramme
AET : temps d'éjection aortique	EDTA : éthylène diamine tétra-acétique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	EFR : exploration fonctionnelle respiratoire
<i>ANOVA</i> : analysis of variance	<i>EGF</i> : epidermal growth factor
Ao : aorte	<i>eNOS</i> : endothelial NO synthase
AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs	<i>ERK</i> : extracellular signal regulated kinase
AP : artère pulmonaire	ETT : échographie cardiaque trans-thoracique
ARN : acide ribo-nucléique	<i>FAC</i> : fractional area change
<i>ASA</i> : american society of anesthesiologists	FC : fréquence cardiaque
ATP : adénosine tri-phosphate	<i>FCS</i> : fetal calf serum
<i>AU</i> : arbitrary unit	FEVD : fraction d'éjection du VD
BAC : barrière alvéolo-capillaire	FEVG : fraction d'éjection du VG
<i>BE</i> : base excess	<i>FGF</i> : fibroblast growth factor
<i>BMPR2</i> : bone morphogenic protein receptor type 2	<i>FGF</i> : fibroblast growth factor
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive	FR : fréquence respiratoire
CBNPC : cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules	GCs : guanylate cyclase soluble
CEPs : cellules endothéliales pulmonaires	GLS : global longitudinal strain
cGMP : guanosine monophosphate cyclique	Hb : hémoglobine
CHU : centre hospitalo-universitaire	HCO ₃ ⁻ : bicarbonatémie
CML : cellule musculaire lisse	HDJ : hospitalisation de jour
<i>CO</i> : cardiac output	HES : hématoxylline-éosine-safran
<i>COPD</i> : chronic obstructive pulmonary disease	<i>HIF-1</i> : hypoxia induced factor-1
COX : cyclooxigénase	Ht : hématocrite
CPBC : cancers broncho-pulmonaires à petites cellules	HTA : hypertension artérielle
<i>CPET</i> : cardio-pulmonary exercise test	HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
CPT : capacité pulmonaire totale	HTP : hypertension pulmonaire
<i>CTEPH</i> : chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension	I/E ratio : ratio temps inspiratoire / temps expiratoire
<i>CTGF</i> : connective tissue growth factor	IC95% : intervalle de confiance à 95%
CV : capacité vitale	<i>ICAM</i> : inter-cellular adhesion molecule
<i>D0</i> : day 0	<i>ICU</i> : intensive care unit
<i>D28</i> : day 28	<i>IGF</i> : insulin-like growth factor
<i>D3</i> : day 3	IP : Insuffisance pulmonaire
<i>D7</i> : day 7	<i>IRB</i> : institutional review board
DC droit : débit cardiaque droit	IRM : imagerie par résonance magnétique
DC gauche : débit cardiaque gauche	IT : insuffisance tricuspide
DLCO : capacité de diffusion du CO	ITV (VTI) : intégrale temps vitesse
dP/dt : variation de pression sur variation de temps	J0 : Jour 0
	J28 : 28ème jour
	J3 : 3ème jour

Liste des Abréviations

J7 : 7ème jour	<i>PCNA</i> : <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
K : Kaliémie	<i>PCNA</i> : <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
KDIGO : kidney disease improving global outcomes	<i>PCPW</i> : <i>pulmonary capillary wedge pressure</i>
LAX : coupe parasternale long axe	<i>PDGF</i> : <i>platelet-derived growth factor</i>
<i>LV</i> : <i>left ventricle</i>	<i>PEEP</i> : <i>positive end-expiratory pressure</i>
LVAWd : épaisseur de la paroi antérieure du VG en diastole	PEP : pression expiratoire positive
<i>LVEDV</i> : <i>LV end-diastolic volume</i>	PET : temps d'éjection pulmonaire
<i>LVEF</i> : <i>left ventricle ejection fraction</i>	<i>PH</i> : <i>pulmonary hypertension</i>
<i>LVOT</i> : <i>left ventricle outflow tract</i>	PLC : phospholipase C
<i>LVSF</i> : <i>left ventricle shortening fraction</i>	PM : partiellement musclicarisé
M : complètement musclicarisé	PN : pneumectomie
MCT : monocrotaline	POD : pression de l'oreillette droite
MCT : monocrotaline	POG : pression de l'oreillette gauche
<i>mPAP</i> : <i>mean pulmonary arterial pressure</i>	PPC : pré-conditionnement pulmonaire
MPI : indice de performance myocardique de Tei	<i>PVR</i> : <i>pulmonary valve regurgitation</i>
<i>mRNA</i> : <i>messenger ribonucleic acid</i>	<i>PVR</i> : <i>pulmonary vascular resistance</i>
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	<i>qRT-PCR</i> : <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
Na : natrémie	<i>RAP</i> : <i>right atrial pressure</i>
NM : non musclicarisé	<i>RIPC</i> : <i>remote ischemic preconditioning</i>
OD : oreillette droite	RTK : récepteur tyrosine kinase
OG : oreillette gauche	<i>RV</i> : <i>right ventricle</i>
<i>OLV</i> : <i>one lung ventilation</i>	<i>RV-FAC</i> : <i>right ventricle fractional area change</i>
OMS : organisation Mondiale de la Santé	<i>RVEDV</i> : <i>RV end-diastolic volume</i>
OPP : œdème pulmonaire post-pneumectomie (PPE : post-pneumectomy edema)	<i>RVEF</i> : <i>RV ejection fraction</i>
<i>P-EC(s)</i> : <i>pulmonary endothelial cell(s)</i>	<i>RVHI</i> : <i>RV hypertrophy index</i>
<i>PA</i> : <i>pulmonary artery</i>	<i>RVLW</i> : <i>RV lateral wall</i>
<i>PA-SMC(s)</i> : <i>pulmonary artery smooth muscle cell(s)</i>	<i>RVOT</i> : <i>right ventricle outflow tract</i>
<i>PAAL</i> : <i>prolonged alveolar air leak</i>	RVP : résistances vasculaires pulmonaires
PaCO ₂ : pression artérielle en CO ₂	RVS : résistances vasculaires systémiques
<i>PACU</i> : <i>post-anesthesia care unit</i>	<i>RVSP</i> : <i>right ventricle systolic pressure</i>
PAD : pression artérielle diastolique	<i>RWT</i> : <i>relative wall thickness</i>
PAM : pression artérielle moyenne	SaO ₂ : saturation artérielle en O ₂
PaO ₂ : pression artérielle en O ₂	SAX : coupe parasternale petit axe
PAP : pression artérielle pulmonaire, <i>pulmonary arterial pressure</i>	<i>SD</i> : <i>standard deviation</i>
PAPd : pression artérielle pulmonaire diastolique	SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigue
PAPm : pression artérielle pulmonaire moyenne	<i>SEM</i> : <i>standard error of the mean</i>
PAPO : pression artérielle pulmonaire occluse	<i>SSRE</i> : <i>shear stress responsive element</i>
PAPS : pression artérielle pulmonaire systolique	<i>STAT3</i> : <i>signal transducer and activator of transcription-3</i>
PAS : pression artérielle systolique	<i>SV</i> : <i>systolic volume</i>
PAT : temps d'accélération pulmonaire	<i>TAPSE</i> : <i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>
<i>PBS</i> : <i>phosphate buffered saline</i>	TDE : temps de décélération de l'onde E
PCapP : pression capillaire pulmonaire	<i>TGF-β / TGF beta</i> : <i>transforming growth factor béta</i>

Liste des Abréviations

TRSV : trouble du rythme supra-ventriculaire

TV : tricuspid valve

TVR : tricuspid valve regurgitation

UI : unités internationales

V/Q : rapport ventilation / perfusion

VC : ventilation contrôlée

VCI : veine cave inférieure

VCS : veine cave supérieure

VD : ventricule droit

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEMS : volume expiré maximal

VES : volume d'éjection systolique

VG : ventricule gauche

VG + S : poids du VG + septum

VO₂ max : consommation maximale en oxygène

VP : veine pulmonaire

VPH : vasoconstriction pulmonaire hypoxique

VT : volume courant

WHO : world health organization

WHO QOL : questionnaire OMS de qualité de vie

REFERENCES

- [1] Berthet J-P, Attard O, Solovei L, Bourdin A, Serre I, Molinari N, et al. Delayed pulmonary arterial hypertension in relation to pulmonary damage score after pneumonectomy under protective ventilation: experimental study. *Eur Surg Res* 2013;51:170–80. <https://doi.org/10.1159/000357058>.
- [2] Perros F, Sentenac P, Boulate D, Manaud G, Kotsimbos T, Lecerf F, et al. Smooth Muscle Phenotype in Idiopathic Pulmonary Hypertension: Hyper-Proliferative but not Cancerous. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20:3575. <https://doi.org/10.3390/ijms20143575>.
- [3] Right Ventricular Dysfunction Incidence After Major Lung Resection - Full Text View - ClinicalTrials.gov n.d. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03032900?term=resecho&rank=1> (accessed February 24, 2017).
- [4] University Hospital, Montpellier. Intraoperative Ventilatory Leak Flow to Predict Prolonged Alveolar Air Leak After Lung Resection Surgery: a Prospective Study. clinicaltrials.gov; 2019.
- [5] University Hospital, Montpellier. Analgesic Non Inferiority of the Thoracic Bi-block Combining an Erector Spinae Muscle Plane Block and a Serratus Anterior Muscle Plane Block in Comparison With Thoracic Epidural for Video-Assisted Thoracic Surgery. clinicaltrials.gov; 2020.
- [6] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [7] Haute Autorité de Santé - ALD n° 30 - Cancer du poumon et Mésothéliome pleural malin n.d. http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_820058/fr/ald-n-30-cancer-du-poumon-et-mesotheliome-pleural-malin (accessed January 29, 2016).
- [8] Lung cancer: diagnosis and management | Guidance and guidelines | NICE n.d. <http://www.nice.org.uk/guidance/CG121> (accessed January 29, 2016).
- [9] Graham EA, Singer JJ. SUCCESSFUL REMOVAL OF AN ENTIRE LUNG FOR CARCINOMA OF THE BRONCHUS. *JAMA* 1933;101:1371–4. <https://doi.org/10.1001/jama.1933.02740430017005>.
- [10] Thomas PA, Berbis J, Baste J-M, Le Pimpec-Barthes F, Tronc F, Falcoz P-E, et al.

Pneumonectomy for lung cancer: contemporary national early morbidity and mortality outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015;149:73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.09.063>.

[11] Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* 2017;28:iv1–21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222>.

[12] Janet-Vendroux A, Loi M, Bobbio A, Lococo F, Lupo A, Ledinot P, et al. Which is the Role of Pneumonectomy in the Era of Parenchymal-Sparing Procedures? Early/Long-Term Survival and Functional Results of a Single-Center Experience. *Lung* 2015;193:965–73. <https://doi.org/10.1007/s00408-015-9810-y>.

[13] Thomas PA, Falcoz P-E, Bernard A, Le Pimpec-Barthes F, Jougon J, Brouchet L, et al. Bilobectomy for lung cancer: contemporary national early morbidity and mortality outcomes. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016;49:e38–43. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezv407>.

[14] Mansour Z, Kochetkova EA, Santelmo N, Meyer P, Wihlm J-M, Quoix E, et al. Risk factors for early mortality and morbidity after pneumonectomy: a reappraisal. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1737–43. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.07.016>.

[15] Thomas PA, Doddoli C, Barlési F, Reynaud-Gaubert M, Giudicelli R, Fuentes P. Late pulmonary artery stump thrombosis with post embolic pulmonary hypertension after pneumonectomy. *Thorax* 2006;61:177–8. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.028480>.

[16] Kim JB, Lee SW, Park S-I, Kim YH, Kim DK. Risk factor analysis for postoperative acute respiratory distress syndrome and early mortality after pneumonectomy: The predictive value of preoperative lung perfusion distribution. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2010;140:26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.11.021>.

[17] Kopec SE, Irwin RS, Umali-Torres CB, Balikian JP, Conlan AA. The postpneumonectomy state. *CHEST Journal* 1998;114:1158–1184.

[18] Rozenchwajg S, Desthieux C, Szymkiewicz O, Ynineb Y, Fulgencio J-P, Bonnet F. The risk of atrial fibrillation after pneumonectomy is not impaired by preoperative administration of dexamethasone. A cohort study. *Anaesth Crit Care Pain Med* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.accpm.2016.04.005>.

[19] Lugg ST, Agostini PJ, Tikka T, Kerr A, Adams K, Bishay E, et al. Long-term impact of developing a postoperative pulmonary complication after lung surgery. *Thorax* 2016;71:171–6.

<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207697>.

[20] McCall PJ, Macfie A, Kinsella J, Shelley BG. Critical care after lung resection: CALoR 1, a single-centre pilot study. *Anaesthesia* 2015;70:1382–9. <https://doi.org/10.1111/anae.13267>.

[21] Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertensionThe Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 2016;37:67–119. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv317>.

[22] Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019;53. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>.

[23] Chaikuad A, Thangaratnarajah C, von Delft F, Bullock AN. Structural consequences of BMPR2 kinase domain mutations causing pulmonary arterial hypertension. *Scientific Reports* 2019;9:18351. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54830-7>.

[24] Frump A, Prewitt A, de Caestecker MP. BMPR2 mutations and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension (2017 Grover Conference Series). *Pulm Circ* 2018;8. <https://doi.org/10.1177/2045894018765840>.

[25] Kuzkov VV, Suborov EV, Kirov MY, Kuklin VN, Sobhkhez M, Johnsen S, et al. Extravascular lung water after pneumonectomy and one-lung ventilation in sheep. *Crit Care Med* 2007;35:1550–9. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000265739.51887.2B>.

[26] Kocatürk M, Salci H, Yilmaz Z, Bayram AS, Koch J. Pre- and post-operative cardiac evaluation of dogs undergoing lobectomy and pneumonectomy. *J Vet Sci* 2010;11:257–64.

[27] Little AG, Langmuir VK, Singer AH, Skinner DB. Hemodynamic pulmonary edema in dog lungs after contralateral pneumonectomy and mediastinal lymphatic interruption. *Lung* n.d.;162:139–45. <https://doi.org/10.1007/BF02715641>.

[28] Sage E, Mercier O, Herve P, Tu L, Darteville P, Eddahibi S, et al. Right lung ischemia induces contralateral pulmonary vasculopathy in an animal model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;143:967–73. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.12.052>.

[29] Okada K, Tanaka Y, Bernstein M, Zhang W, Patterson GA, Botney MD. Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of

pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1997;151:1019–25.

[30] White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL, et al. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L583-590. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00321.2006>.

[31] Dorfmueller P, Chaumais M-C, Giannakouli M, Durand-Gasselini I, Raymond N, Fadel E, et al. Increased oxidative stress and severe arterial remodeling induced by permanent high-flow challenge in experimental pulmonary hypertension. *Respir Res* 2011;12:119. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-119>.

[32] Happé CM, de Raaf MA, Rol N, Schaliij I, Vonk-Noordegraaf A, Westerhof N, et al. Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2016;310:L1088-1097. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00023.2016>.

[33] Zhu R, He L, Xu J, Zhang Y, Hu Y. [Changes of TGF- β 1 and CTGF in rats with increased blood flow-induced pulmonary artery hypertension]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2012;37:1013–20. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-7347.2012.10.008>.

[34] Potaris K, Athanasiou A, Konstantinou M, Zaglavira P, Theodoridis D, Syrigos KN. Pulmonary hypertension after pneumonectomy for lung cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2014;22:1072–9. <https://doi.org/10.1177/0218492314527992>.

[35] Bigatello LM, Allain R, Gaissert HA. Acute lung injury after pulmonary resection. *Minerva Anesthesiol* 2004;70:159–66.

[36] Pedoto A, Amar D. Right heart function in thoracic surgery: role of echocardiography. *Curr Opin Anaesthesiol* 2009;22:44–9. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e32831d7b72>.

[37] Foroulis CN, Kotoulas CS, Kakouros S, Evangelatos G, Chassapis C, Konstantinou M, et al. Study on the late effect of pneumonectomy on right heart pressures using Doppler echocardiography. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:508–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2004.05.036>.

[38] Cryer HG, Mavroudis C, Yu J, Roberts AM, Cue JI, Richardson JD, et al. Shock, Transfusion, and Pneumonectomy: Death Is Due to Right Heart Failure and Increased Pulmonary Vascular Resistance. *Annals of Surgery* 1990;212:197.

[39] Harrison RW, Adams WE, Long ET, Burrows B, Reimann A. The clinical significance of

cor pulmonale in the reduction of cardiopulmonary reserve following extensive pulmonary resection. *J Thorac Surg* 1958;36:352–68.

[40] Okada M, Ota T, Okada M, Matsuda H, Okada K, Ishii N. Right ventricular dysfunction after major pulmonary resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:503–11.

[41] McCall PJ, Arthur A, Glass A, Corcoran DS, Kirk A, Macfie A, et al. The right ventricular response to lung resection. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2019;158:556-565.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.01.067>.

[42] Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmüller P, Adnot S, Eddahibi S. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol* 2008;49:113–8. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.06.003>.

[43] Rahaghi FN, Lazea D, Dihya S, San José Estépar R, Bueno R, Sugarbaker D, et al. Preoperative pulmonary vascular morphology and its relationship to postpneumectomy hemodynamics. *Acad Radiol* 2014;21:704–10. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2014.02.010>.

[44] Mercier O, Sage E, de Perrot M, Tu L, Marcos E, Decante B, et al. Regression of flow-induced pulmonary arterial vasculopathy after flow correction in piglets. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:1538–46. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.07.069>.

[45] Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, et al. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 2006;113:1857–64. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591321>.

[46] Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, et al. Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S20–31. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.018>.

[47] Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MAJ, Berger RMF. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;305:L1-14. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00031.2013>.

[48] Corno AF, Tozzi P, Genton CY, von Segesser LK. Surgically induced unilateral pulmonary hypertension: time-related analysis of a new experimental model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;23:513–7. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(03\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(03)00025-3).

[49] Reesink HJ, Marcus JT, Tulevski II, Jamieson S, Kloek JJ, Noordegraaf AV, 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. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2007;133:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2006.09.032>.

[50] Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, van Beneden R, Remmelink M, Brimiouille S, et al. Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003;107:1329–35. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000053443.27512.33>.

[51] Rondelet B, Dewachter L, Kerbaul F, Dewachter C, Hubloue I, Fesler P, et al. Sildenafil added to sitaxsentan in overcirculation-induced pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2010;299:H1118-1123. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00418.2010>.

[52] Wauthy P, Abdel Kafi S, Mooi WJ, Naeije R, Brimiouille S. Inhaled nitric oxide versus prostacyclin in chronic shunt-induced pulmonary hypertension. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003;126:1434–41. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(03\)01183-8](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(03)01183-8).

[53] Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, et al. Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American Society of Echocardiography: Endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2010;23:685–713. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2010.05.010>.

[54] Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation* 2008;117:1436–48. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.653576>.

[55] Asakura K, Mitsuboshi S, Tsuji M, Sakamaki H, Otake S, Matsuda S, et al. Pulmonary arterial enlargement predicts cardiopulmonary complications after pulmonary resection for lung cancer: a retrospective cohort study. *J Cardiothorac Surg* 2015;10:113. <https://doi.org/10.1186/s13019-015-0315-9>.

[56] Park JJ, Park J-B, Park J-H, Cho G-Y. Global Longitudinal Strain to Predict Mortality in Patients With Acute Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2018;71:1947–57. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.064>.

- [57] Sachdev A, Villarraga HR, Frantz RP, McGoon MD, Hsiao J-F, Maalouf JF, et al. Right ventricular strain for prediction of survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2011;139:1299–309. <https://doi.org/10.1378/chest.10-2015>.
- [58] Shukla M, Park J-H, Thomas JD, Delgado V, Bax JJ, Kane GC, et al. Prognostic Value of Right Ventricular Strain Using Speckle-Tracking Echocardiography in Pulmonary Hypertension: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Canadian Journal of Cardiology* 2018;34:1069–78. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2018.04.016>.
- [59] Guihaire J. Remodelage du Ventricule Droit dans l’Hypertension Pulmonaire Chronique Expérimentale. phdthesis. Université Paris Sud - Paris XI, 2014.
- [60] 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. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.10.026>.
- [61] Kowalewski J, Brocki M, Dryjański T, Kaprón K, Barcikowski S. Right ventricular morphology and function after pulmonary resection. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:444–8. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(99\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(99)00032-9).
- [62] Venuta F, Sciomer S, Andreetti C, Anile M, Giacomo TD, Rolla M, et al. Long-term Doppler echocardiographic evaluation of the right heart after major lung resections. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:787–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2007.07.033>.
- [63] Elrakhawy HM, Alassal MA, Shaalan AM, Awad AA, Sayed S, Saffan MM. Impact of Major Pulmonary Resections on Right Ventricular Function: Early Postoperative Changes. *The Heart Surgery Forum* 2018;21:E009-E017. <https://doi.org/10.1532/hsf.1864>.
- [64] Naeije R, Badagliacca R. The overloaded right heart and ventricular interdependence. *Cardiovasc Res* 2017;113:1474–85. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx160>.
- [65] Wang Z, Yuan J, Chu W, Kou Y, Zhang X. Evaluation of left and right ventricular myocardial function after lung resection using speckle tracking echocardiography. *Medicine (Baltimore)* 2016;95. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004290>.
- [66] Cavalheri V, Granger C. Preoperative exercise training for patients with non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;6:CD012020. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012020.pub2>.
- [67] Tašková A, Drösslerová M, Brat K, Hytych V, Vašáková M. Preoperative evaluation of patients undergoing lung resection using cardiopulmonary exercise testing in predicting

postoperative respiratory complications. *European Respiratory Journal* 2018;52. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2018.PA2764>.

[68] Badagliacca R, Papa S, Poscia R, Valli G, Pezzuto B, Manzi G, et al. The added value of cardiopulmonary exercise testing in the follow-up of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 2019;38:306–14. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.11.015>.

[69] Amar D, Roistacher N, Burt M, Reinsel RA, Ginsberg RJ, Wilson RS. Clinical and echocardiographic correlates of symptomatic tachydysrhythmias after noncardiac thoracic surgery. *Chest* 1995;108:349–54.

[70] Amar D, Burt ME, Roistacher N, Reinsel RA, Ginsberg RJ, Wilson RS. Value of perioperative Doppler echocardiography in patients undergoing major lung resection. *Ann Thorac Surg* 1996;61:516–20. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(95\)00939-6](https://doi.org/10.1016/0003-4975(95)00939-6).

[71] Amar D, Roistacher N, Burt ME, Rusch VW, Bains MS, Leung DH, et al. Effects of diltiazem versus digoxin on dysrhythmias and cardiac function after pneumonectomy. *Ann Thorac Surg* 1997;63:1374–81; discussion 1381-1382.

[72] Mandal B, Dutta V, Kumar B, Kumar A, Ganesan R, Bhat IH. Echocardiographic Evaluation of Right Ventricular Function in the Immediate Postoperative Period after Major Pulmonary Resections: A Prospective Observational Study. *Journal of Perioperative Echocardiography* 2017;5:42–8. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10034-1070>.

[73] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–36.

[74] Wu ZK, Tarkka MR, Eloranta J, Pehkonen E, Laurikka J, Kaukinen L, et al. Effect of ischaemic preconditioning, cardiopulmonary bypass and myocardial ischaemic/reperfusion on free radical generation in CABG patients. *Cardiovasc Surg* 2001;9:362–8.

[75] Wu Z-K, Laurikka J, Saraste A, Kytö V, Pehkonen EJ, Savunen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ischemic preconditioning in open heart operations. *Ann Thorac Surg* 2003;76:528–34.

[76] Wu Z-K, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR. Ischemic Preconditioning Suppresses Ventricular Tachyarrhythmias After Myocardial Revascularization. *Circulation* 2002;106:3091–6. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000041430.32233.5B>.

[77] Laurikka J, Wu Z-K, Iisalo P, Kaukinen L, Honkonen EL, Kaukinen S, et al. REgional

ischemic preconditioning enhances myocardial performance in off-pump coronary artery bypass grafting*. *Chest* 2002;121:1183–9. <https://doi.org/10.1378/chest.121.4.1183>.

[78] Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *The Lancet* 1993;342:276–7. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91819-8](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91819-8).

[79] Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L’Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143–8. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.558122>.

[80] Fiorentino F, Angelini GD, Suleiman M-S, Rahman A, Anderson J, Bryan AJ, et al. Investigating the effect of remote ischaemic preconditioning on biomarkers of stress and injury-related signalling in patients having isolated coronary artery bypass grafting or aortic valve replacement using cardiopulmonary bypass: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015;16:181. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-0696-z>.

[81] Healy D, Clarke-Moloney M, Gaughan B, O’Daly S, Hausenloy D, Sharif F, et al. Preconditioning Shields Against Vascular Events in Surgery (SAVES), a multicentre feasibility trial of preconditioning against adverse events in major vascular surgery: study protocol for a randomised control trial. *Trials* 2015;16. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-0678-1>.

[82] Kinoshita H. Another Role of Limb Remote Ischemic Preconditioning in Patients with Lung Cancer: *Anesthesiology* 2015;122:955–6. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000600>.

[83] Montani D, Chaumais M-C, Savale L, Natali D, Price LC, Jaïs X, et al. Phosphodiesterase type 5 inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *Adv Ther* 2009;26:813–25. <https://doi.org/10.1007/s12325-009-0064-z>.

[84] Wharton J, Strange JW, Møller GMO, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005;172:105–13. <https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1587OC>.

[85] Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadaş B, et al. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;44:1488–96. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.06.060>.

[86] Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. Sildenafil citrate

therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine* 2005;353:2148–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050010>.

[87] Sastry BKS, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS. Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;43:1149–53. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.10.056>.

[88] Thomas BG, Maloney JD. Use of silfenadil for treatment of respiratory distress after pneumonectomy for bronchogenic carcinoma. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2007;6:262–3. <https://doi.org/10.1510/icvts.2006.144261>.

[89] Humbert Marc, Lau Edmund M.T., Montani David, Jaïs Xavier, Sitbon Oliver, Simonneau Gérald. Advances in Therapeutic Interventions for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2014;130:2189–208. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006974>.

[90] Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani H-A, et al. Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine* 2013;369:809–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213917>.

[91] Simonneau G, Torbicki A, Hoeper MM, Delcroix M, Karlócai K, Galiè N, et al. Selexipag: an oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The European Respiratory Journal* 2012;40:874–80. <https://doi.org/10.1183/09031936.00137511>.

[92] Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* 2005;112:423–31. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.540542>.

[93] Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselien I, Tcherakian C, Le Pavec J, et al. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:81–8. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1037OC>.

[94] Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest* 2009;119:512–23. <https://doi.org/10.1172/JCI35070>.

- [95] Cabodi S, Tinnirello A, Di Stefano P, Bisarò B, Ambrosino E, Castellano I, et al. p130Cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and HER2-neu oncogene-dependent breast tumorigenesis. *Cancer Res* 2006;66:4672–80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2909>.
- [96] Tu L, De Man FS, Girerd B, Huertas A, Chaumais M-C, Lecerf F, et al. A Critical Role for p130Cas in the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:666–76. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0309OC>.
- [97] Mariani S, Basciani S, Arizzi M, Spera G, Gnessi L. PDGF and the testis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2002;13:11–7. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00518-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00518-5).
- [98] Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA. Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels. *Am J Physiol* 1991;260:H642-646. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.2.H642>.
- [99] Sumpio BE, Du W, Gallagher G, Wang X, Khachigian LM, Collins T, et al. Regulation of PDGF-B in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:349–55.
- [100] Palumbo R, Gaetano C, Antonini A, Pompilio G, Bracco E, Rönstrand L, et al. Different effects of high and low shear stress on platelet-derived growth factor isoform release by endothelial cells: consequences for smooth muscle cell migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002;22:405–11. <https://doi.org/10.1161/hq0302.104528>.
- [101] Liu SQ, Tieche C, Tang D, Alkema P. Pattern formation of vascular smooth muscle cells subject to nonuniform fluid shear stress: role of PDGF-beta receptor and Src. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2003;285:H1081-1090. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00434.2003>.
- [102] Dardik A, Yamashita A, Aziz F, Asada H, Sumpio BE. Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1alpha. *J Vasc Surg* 2005;41:321–31. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2004.11.016>.
- [103] Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Gimbrone MA. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4591–5.
- [104] Barst RJ. PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005;115:2691–4. <https://doi.org/10.1172/JCI26593>.

- [105] Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811–21. <https://doi.org/10.1172/JCI24838>.
- [106] Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2002;8:935–42.
- [107] Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galié N, et al. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 2013;127:1128–38. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765>.
- [108] Frost AE, Barst RJ, Hoeper MM, Chang H-J, Frantz RP, Fukumoto Y, et al. Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 2015;34:1366–75. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.05.025>.
- [109] Zhao Y, Lv W, Piao H, Chu X, Wang H. Role of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *J Recept Signal Transduct Res* 2014;34:254–60. <https://doi.org/10.3109/10799893.2014.908915>.
- [110] Fulton RM, Hutchinson EC, Jones AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J* 1952;14:413–20. <https://doi.org/10.1136/hrt.14.3.413>.
- [111] Birukov KG, Jacobson JR, Flores AA, Ye SQ, Birukova AA, Verin AD, et al. Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003;285:L785–97. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00336.2002>.
- [112] Azuma N, Duzgun SA, Ikeda M, Kito H, Akasaka N, Sasajima T, et al. Endothelial cell response to different mechanical forces. *Journal of Vascular Surgery* 2000;32:789–94. <https://doi.org/10.1067/mva.2000.107989>.
- [113] Andruska A, Spiekerkoetter E. Consequences of BMPR2 Deficiency in the Pulmonary Vasculature and Beyond: Contributions to Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19092499>.
- [114] Hautefort A, Mendes-Ferreira P, Sabourin J, Manaud G, Bertero T, Rucker-Martin C, et al. Bmpr2 Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial

Hypertension. *Circulation* 2019;139:932–48.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033744>.

[115] Gomez-Arroyo J, Saleem SJ, Mizuno S, Syed AA, Bogaard HJ, Abbate A, et al. A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L977–91. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00362.2011>.

[116] Hsia CC, Herazo LF, Fryder-Doffey F, Weibel ER. Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy. *J Clin Invest* 1994;94:405–12.

[117] Le Cras TD, Fernandez LG, Pastura PA, Laubach VE. Vascular growth and remodeling in compensatory lung growth following right lobectomy. *J Appl Physiol* 2005;98:1140–8. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00479.2004>.

[118] Fernandez LG, Mehta CK, Kron IL, Laubach VE. Reinitiation of compensatory lung growth after subsequent lung resection. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2007;134:1300–5. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.07.005>.

[119] Almeida FM, Saraiva-Romanholo BM, Vieira RP, Moriya HT, Ligeiro-de-Oliveira AP, Lopes FD, et al. Compensatory lung growth after bilobectomy in emphysematous rats. *PLoS ONE* 2017;12:e0181819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181819>.

[120] Sentenac P, Samarani G, Bideaux P, Sicard P, Bourdois B, Richard S, et al. Pulmonary hypertension after pneumonectomy: a preclinical model in rats and human pulmonary endothelial cells. *Eur J Cardiothorac Surg* n.d. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa277>.

[121] Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Executive Summary: Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 2016;63:575–82. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw504>.

[122] Salati M, Brunelli A. Risk Stratification in Lung Resection. *Current Surgery Reports* 2016;4. <https://doi.org/10.1007/s40137-016-0158-x>.

[123] Miyazawa M, Haniuda M, Nishimura H, Kubo K, Amano J. Longterm effects of pulmonary resection on cardiopulmonary function. *J Am Coll Surg* 1999;189:26–33.

[124] Licker M, de Perrot M, Spiliopoulos A, Robert J, Diaper J, Chevalley C, et al. Risk factors for acute lung injury after thoracic surgery for lung cancer. *Anesth Analg* 2003;97:1558–65. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000087799.85495.8a>.

- [125] Parquin F, Marchal M, Mehiri S, Hervé P, Lescot B. Post-pneumonectomy pulmonary edema: analysis and risk factors. *Eur J Cardiothorac Surg* 1996;10:929–32; discussion 933.
- [126] van der Werff YD, van der Houwen HK, Heijmans PJ, Duurkens VA, Leusink HA, van Heeswijk HP, et al. Postpneumonectomy pulmonary edema. A retrospective analysis of incidence and possible risk factors. *Chest* 1997;111:1278–84.
- [127] Turnage WS, Lunn JJ. Postpneumonectomy Pulmonary Edema: A Retrospective Analysis of Associated Variables. *Chest* 1993;103:1646–50. <https://doi.org/10.1378/chest.103.6.1646>.
- [128] Slinger PD. Acute Lung Injury After Pulmonary Resection: More Pieces of the Puzzle: Anesthesia & Analgesia 2003;97:1555–7. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000098363.76962.A2>.
- [129] Partovian C, Adnot S, Eddahibi S, Teiger E, Levame M, Dreyfus P, et al. Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1998;275:H1948–56. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.6.H1948>.
- [130] Partovian C, Adnot S, Raffestin B, Louzier V, Levame M, Mavier IM, et al. Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:762–71. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.6.4106>.
- [131] Thomas L, Marwick TH, Popescu BA, Donal E, Badano LP. Left Atrial Structure and Function, and Left Ventricular Diastolic Dysfunction: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:1961–77. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.059>.
- [132] Members AF, McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012;33:1787–847. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs104>.
- [133] Pieske B, Tschöpe C, Boer RA de, Fraser AG, Anker SD, Donal E, et al. How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA–PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *European Journal of Heart Failure* 2020;22:391–412. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1741>.

- [134] Moñivas Palomero V, Durante-Lopez A, Sanabria MT, Cubero JS, González-Mirelis J, Lopez-Ibor JV, et al. Role of Right Ventricular Strain Measured by Two-Dimensional Echocardiography in the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis. *J Am Soc Echocardiogr* 2019;32:845-853.e1. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2019.03.005>.
- [135] Zairi I, Mzoughi K, Jnifene Z, Kamoun S, Jabeur M, Ben Moussa F, et al. Speckle tracking echocardiography in systemic sclerosis: A useful method for detection of myocardial involvement. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2019;68:226–31. <https://doi.org/10.1016/j.ancard.2018.08.027>.
- [136] Barthur A, Brezden-Masley C, Connelly KA, Dhir V, Chan KKW, Haq R, et al. Longitudinal assessment of right ventricular structure and function by cardiovascular magnetic resonance in breast cancer patients treated with trastuzumab: a prospective observational study. *J Cardiovasc Magn Reson* 2017;19:44. <https://doi.org/10.1186/s12968-017-0356-4>.
- [137] Evaldsson AW, Ingvarsson A, Smith JG, Rådegran G, Roijer A, Waktare J, et al. Echocardiographic right ventricular strain from multiple apical views is superior for assessment of right ventricular systolic function. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 2019;39:168–76. <https://doi.org/10.1111/cpf.12552>.
- [138] Zhang K, Braun A, von Koeckritz F, Schmuck RB, Teegen EM, Cuspidi C, et al. Right Heart Remodeling in Patients with End-Stage Alcoholic Liver Cirrhosis: Speckle Tracking Point of View. *J Clin Med* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/jcm8091285>.
- [139] Kemal HS, Kayıkçıoğlu M, Nalbantgil S, Can LH, Moğulkoç N, Kültürsay H. Assessment of right ventricular function in patients with pulmonary arterial hypertension-congenital heart disease and repaired and unrepaired defects: Correlation among speckle tracking, conventional echocardiography, and clinical parameters. *Anatol J Cardiol* 2020;23:277–87. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2020.01379>.
- [140] Nafati C, Gardette M, Leone M, Reydellet L, Blasco V, Lannelongue A, et al. Use of speckle-tracking strain in preload-dependent patients, need for cautious interpretation! *Ann Intensive Care* 2018;8. <https://doi.org/10.1186/s13613-018-0376-8>.
- [141] Wink J, Veering BT, Aarts LPHJ, Wouters PF. Effects of Thoracic Epidural Anesthesia on Neuronal Cardiac Regulation and Cardiac Function. *Anesthes* 2019. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002558>.

RESUME

CONTEXTE ET OBJECTIFS: L'hypertension pulmonaire (HTP) et l'insuffisance cardiaque droite contribuent au taux de morbidité élevé observé après chirurgie de résection pulmonaire. La physiopathologie est encore mal connue. L'objectif était d'étudier le remodelage vasculaire pulmonaire après pneumonectomie droite (PN) chez le rat, et d'explorer *in vitro* les mécanismes impliqués sur des cellules humaines soumises à un *shear stress*. Chez les patients, l'objectif était de déterminer l'incidence de dysfonctionnement ventriculaire droite (VD) précoce après résection pulmonaire majeure, évaluée par le strain longitudinal de la paroi latérale du VD (RVLW), un nouveau marqueur de fonction systolique VD.

METHODES: Soixante rats mâles *Sprague-Dawley* ont subi soit une PN droite ou une chirurgie sham. Dix rats par groupe ont été sacrifiés au 3^{ème}, 7^{ème} et 28^{ème} jours postopératoires (J3, J7, J28). Les altérations cardio-pulmonaires ont été étudiées par des analyses échocardiographiques, hémodynamiques et histologiques. Un antagoniste compétitif du récepteur β du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- β), appelé inhibiteur A4, a été administré entre J0 et J28 chez dix rats en prévention de l'HTP. *In vitro*, le *shear stress* a été reproduit à l'aide d'un système FlexCell™ Tension. Un étirement cyclique pathologique (allongement de 18%) a été appliqué sur des cellules endothéliales pulmonaires (P-ECs) humaines pour évaluer l'impact sur la croissance des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (PA-SMCs). Les facteurs de croissance ont été dosés dans les P-ECs par qRT-PCR. Une étude prospective a été menée au CHU de Montpellier (France). Tous les patients opérés d'une chirurgie de résection pulmonaire majeure, sans hypertension pulmonaire ni dysfonction VD préexistante, étaient éligibles. Une échocardiographie standardisée (GE® Vivid iq™) a été réalisée en préopératoire puis aux jours 1, 2 et 3 postopératoires par le même examinateur. Le critère d'évaluation était la survenue d'une dysfonction VD définie par un RVLW *longitudinal strain* supérieur à -15%. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD.

RESULTATS: La pression artérielle pulmonaire (PAP) moyenne a progressivement augmenté dans le groupe PN pour atteindre 35 \pm 7 mmHg à J28 vs 18 \pm 4 (sham) ($P=0.001$), de même que la proportion d'artères pulmonaires distales muscularisées, 83 \pm 1% vs 5 \pm 1 respectivement ($P<0.001$), liée à une prolifération *in situ* de PA-SMC. La surface télé-diastolique du VD et l'épaisseur de la paroi latérale VD étaient doublées dans le groupe PN à J28. La fraction d'éjection du ventricule gauche était diminuée à J7 et J28 tandis que la fonction systolique VD était préservée. *In vitro*, la croissance des PA-SMCs humaines était significativement plus élevée avec le milieu de culture des P-ECs « *stretchées* » vs « *non stretchées* ». Cela a permis de mettre en évidence le rôle du *shear stress* sur la fonction paracrine de la P-EC. Le PDGF était le principal facteur de croissance impliqué. Chez le rat, un traitement par antagoniste du PDGFR- β a diminué la PAP systolique après PN, de 69 \pm 10 (PN) à 46 \pm 6 mmHg (PN+A4) ($P=0.0005$), et l'indice d'hypertrophie du VD de 0.52 \pm 0.09 à 0.42 \pm 0.06 respectivement ($P=0.004$). Entre Février 2017 et Juillet 2018, 110 patients ont été inclus, 92 ont été analysés, âge moyen 65 \pm 10 ans, 59% d'hommes, BPCO dans 41% des cas, 74 lobectomie (80%), 8 pneumonectomie (9%), 6 bilobectomie (7%). Le RVLW *longitudinal strain* s'altérait dans les trois premiers jours chez 55% des patients (IC 0.44—0.66), passant de -20 \pm 7% (J0) à -16 \pm 6 (J3) ($P=0.002$). Le *strain* des segments de la RVLW (basal, moyen et apex) était altéré de manière homogène. Un TAPSE altéré a été observé chez 15% des patients, préférentiellement après pneumonectomie ou bilobectomie qu'après lobectomie ($P=0.04$). L'onde S à l'anneau tricuspide et la fraction de raccourcissement de surface (RV-FAC) n'ont pas changé de manière significative. Une HTP survenait chez 11% des patients. La PAPS augmentait de 19 \pm 9 (J0) à 21 \pm 11 (J3) mmHg ($P=0.006$). Le seul paramètre corrélé avec le RVLW *strain* était l'onde S à l'anneau tricuspide. Nous n'avons pas mis en évidence de facteurs de risque ni de complications postopératoires associées à un RVLW *strain* altéré.

CONCLUSIONS: Chez le rat, la pneumonectomie droite a conduit à une HTP liée à une forte muscularisation des artères pulmonaires distales et associait un remodelage sélectif du VD. *In vitro*, le *shear stress* a modifié le contrôle paracrine des P-ECs sur la croissance des PA-SMCs. L'inhibition sélective du PDGFR- β pourrait être une cible thérapeutique. Après chirurgie de résection pulmonaire majeure, le RVLW *strain* a montré un dysfonction précoce du VD chez environ 50% des patients.

Mots clés: Pneumonectomie • Hypertension pulmonaire • Dysfonction ventriculaire droite • Modèle animal • Cellule endothéliale pulmonaire • Facteurs de croissance • PDGF • Échocardiographie.