



HAL
open science

Rôle du microbiote pulmonaire dans le remodelage vasculaire et l'hypertension artérielle pulmonaire : nouvel outil et cible biothérapeutique

Kouamé Kan Firmin Akoumia

► **To cite this version:**

Kouamé Kan Firmin Akoumia. Rôle du microbiote pulmonaire dans le remodelage vasculaire et l'hypertension artérielle pulmonaire : nouvel outil et cible biothérapeutique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ023 . tel-04690005

HAL Id: tel-04690005

<https://theses.hal.science/tel-04690005v1>

Submitted on 6 Sep 2024

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.

Rôle du microbiote pulmonaire dans le remodelage vasculaire pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire : nouvel outil et cible biothérapeutique

Role of the lung microbiota in pulmonary vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension: a new tool and biotherapeutic target

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA) Spécialité de doctorat : Physiologie et physiopathologie
Graduate School : Santé et médicament. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Hypertension pulmonaire : Physiopathologie et nouvelles thérapies (Université Paris-Saclay, INSERM)**,

Sous la direction de, **Sylvia COHEN-KAMINSKY**, PhD, Directrice de recherche CNRS

Thèse soutenue à la Faculté de Médecine du Kremlin-Bicêtre, le 19 Juin 2023,
par

Kouamé Kan Firmin AKOUMIA

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Mr. Marc HUMBERT Professeur, PU-PH INSERM UMR_S999, Université Paris-Saclay	Président
Mme. Véronique FREUND-MICHEL Professeur, PU INSERM 1045 Université de Bordeaux	Rapporteuse & Examinatrice
Mr. Philippe GOSSET Docteur, INSERM UMR_S1019 Université de Lille	Rapporteur & Examineur
Mr. Luc MOUTHON Professeur, PU-PH INSERM UMR_S1016 Université Paris Cité	Examineur
Mme. Muriel THOMAS Docteur, INRAE (MICALIS) Université Paris-Saclay	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été financée par l'Agence Nationale de Recherche (ANR) que je remercie pour son implication dans la recherche en France.

Je dis un grand merci à ma **Directrice de Thèse, Docteur Sylvia COHEN-KAMINSKY** de m'avoir donné cette chance de réaliser ma thèse au sein de son équipe. Madame Sylvia, comme j'ai l'habitude de vous appeler, je vous remercie pour toute votre implication dans cette thèse qui n'a pas été facile avec la crise sanitaire, pour tous vos conseils et pour vos encouragements, pour votre volonté à toujours aller chercher la perfection et l'innovation dans les techniques et les résultats. Au cours de cette expérience, vous m'avez appris des valeurs scientifiques qui sont un peu tombées dans l'oubli, surtout avec la course aux publications.

Ne jamais cesser de perfectionner les acquis et les résultats que nous avons pour toujours viser plus haut. Encore merci de m'avoir fait confiance et surtout merci pour les chocolats qui nous faisaient énormément de bien.

Au Professeur **Marc HUMBERT**, je vous dis merci de m'avoir accueilli au sein de votre unité INSERM UMR-S999 et pour l'honneur que vous me faites en président mon jury de thèse.

Au **Professeur Luc MOUTHON**, merci de m'avoir suivi tout le long de cette thèse pendant les deux comités de suivi et merci également d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineur. Merci pour tous vos encouragements et vos conseils.

Je remercie le **Professeur Véronique FREUND-MICHEL** et le **Docteur Philippe GOSSET** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en qualité de rapporteurs et pour le temps que vous avez consacré à la correction de mon manuscrit.

Je remercie le **Docteur Muriel THOMAS** d'avoir accepté également de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinatrice.

Au **Professeur Geneviève HERY-ARNAUD** et au **Docteur Nicolas LAPAQUE**, je vous remercie pour votre soutien et votre accompagnement durant cette thèse. Merci de m'avoir ouvert les portes de vos locaux lors de mes passages à Brest et à Jouy en Josas. Merci également pour vos conseils et vos idées lors des différentes réunions LUMI.

Je remercie également tous les membres de vos équipes respectives :

Rosyne LAGRAFEUILLE, Stéphanie GOURIOU, Lourdes VELO, Julie CADIOU, Amandine LASHERMES et tous ceux que je n'ai pas pu citer.

Je remercie le **Docteur Frédéric PERROS** qui a financé ma 4^e année de thèse. Merci également de m'avoir impliqué dans de nombreux projets intéressants et pour tous tes conseils et ton aide sur le plan scientifique.

Au laboratoire où j'ai effectué ma thèse

Je remercie le **Professeur David MONTANI**, le **Docteur Maria-Rosa GHIGNA**, le **Docteur Fabrice ANTIGNY**, le **Docteur Véronique CAPUANO** et **Yann RUCHON** pour votre contribution à cette thèse. Merci pour les discussions lors des réunions d'équipe qui nous aident à comprendre cette pathologie.

Merci **Yvonne Dutheil**, je n'ai pas de mots pour te dire suffisamment merci. Tu es une personne merveilleuse avec une patience incroyable. Je ne t'ai jamais vu t'énerver ou changer de mine malgré nos erreurs et nos oublis à répétition. Que Dieu te protège et te donne toujours ce sourire.

Aux Dr **Marceau QUATREDENIERS**, Dr **Morad NAKHLEH** et Dr **Said AMISSI**, je vous remercie tous les trois pour votre accueil au sein de l'équipe et votre soutien.

Merci à toi **Maria VINHAS** pour ton aide et pour l'accueil également

Claudine SHENIN-KING, Cloclo, la go choc, merci pour ta bonne humeur, tu es adorable.

Merci la **Jet Set de l'INSERM U999** : Dr. Julien GRYNBLAT (**Juju**), **le J**, Dr. Hélène Le RIBEUZ (**Heyleiina**), **la H**, Lucille PENALVA MOUSSET (**Lulu**), **la L**, Bastien MASSON (**Baba**), **le B**, Joana GOMES (**Jojo**), **la J** et Firmin AKOUMIA (**Fifi**), **le F**.

Lulu, Baba, Juju et Jojo, bon courage à vous pour vos différentes thèses.

Anaïs **SAINT-MARTIN**, Christelle **EL JEKMEK**, Mary **DUTHEIL**, merci pour votre soutien.

Anaïs, bon courage pour ta thèse.

Bon courage à vous tous pour vos différents projets

Je dis également merci à toute l'équipe de **METABRAIN RESEARCH** et particulièrement à Mme **Micheline KERGOAT**, à **Christelle DELALANDE** et à **Michael BONNET** car sans vous, cette belle expérimentation animale sur le butyrate n'aurait pas eu lieu.

Désolé pour l'odeur du butyrate qui est restée pendant un bon moment dans vos locaux.

Rire

A mes parents, depuis Oupoyo en Côte d'Ivoire, je vous dis merci de tout mon cœur car vous avez cru en moi sans même comprendre, ni savoir ce que c'est qu'une thèse. Pour vous, c'était juste le dernier diplôme et vous l'avez compris et accepté malgré tout le temps que cela a pris. Merci infiniment, je vous aime et vous êtes ma source de motivation.

Grand frère et **Dr. Kiyali OUATTARA**, merci pour tout le soutien et surtout les encouragements. Merci d'avoir pris ton temps pour relire et corriger cette thèse.

Petit frère, **Serge WOROU** merci pour ton soutien et tes corrections pour cette thèse.

Jean Marie-OCTUVON, Baco, je te dis spécialement merci car tu as accepté de m'aider, de te porter garant pour que je puisse trouver un logement. Sans ton aide, je ne serai pas là aujourd'hui. Vraiment merci pour tout

Monsieur **Hervé-Auguste AKOKO**, merci pour tous vos conseils et votre soutien sans lequel je ne sais pas si je serai là aujourd'hui.

A tous mes professeurs et amis du Master de Génétique et amélioration des espèces végétales de l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Merci à tous mes amis et connaissances

A ANGBE KOUAME PHILIPPE

REMERCIEMENTS	3
RESUME	10
ABSTRACT	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS	12
I. LISTE DES FIGURES	12
II. LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	14
AVANT-PROPOS	17
INTRODUCTION	19
I. HYPERTENSION PULMONAIRE (HTP) ET HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE (HTAP)	19
I.1. Définition et classification	19
I.1.1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).....	21
I.1.2. Hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche	23
I.1.3. Hypertension pulmonaire associée à des maladies pulmonaires et/ou à l'hypoxie	23
I.1.4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique	23
I.1.5. Hypertension pulmonaire d'étiologies indéfinies ou multifactorielles	24
I.2. Histopathologie vasculaire dans l'HTAP	24
I.2.1. Lésions intimes	24
I.2.1. Lésions médiales.....	25
I.2.1. Lésions plexiformes.....	26
I.3. Physiopathologie de l'HTAP	26
I.3.1. Mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de l'HTAP	26
I.3.1.1. Dysfonction des cellules endothéliales (CE).....	27
I.3.1.2. Dysfonction des cellules musculaires lisses (CML) artérielles pulmonaires	30
I.3.1.3. Dysfonction des fibroblastes	31
I.3.1.4. Dysfonction des cellules immunitaires	32
I.3.2. Mutations identifiées chez les patients HTAP	33
I.3.3. Médiateurs de la prolifération et du remodelage vasculaire	37
I.3.3.1. Facteurs de croissances	37
I.3.3.2. Sérotonine.....	42
I.3.3.3. Survivine.....	43
I.3.3.4. NMDAR.....	44
I.3.3.4. NGF	44
I.3.4. Altération du tonus vasculaire pulmonaire	45
I.3.4.1. Implication des facteurs vasoconstricteurs (Endothéline-1 et Thromboxane A2)	45
I.3.4.1.1. Endothéline-1.....	45
I.3.4.1.1. Thromboxane A2.....	46
I.3.4.2. Implication des facteurs vasodilatateurs (monoxyde d'azote et prostacycline)	47
I.3.4.2.1. La prostacycline	47
I.3.4.2.2. Le monoxyde d'azote (NO).....	48
I.3.5. Inflammation	49
I.4. Diagnostic de l'HTAP	50
I.5. Traitements de l'HTAP	52
I.5.1. Voie de l'Endothéline : antagonistes des récepteurs à l'endothéline (ERA)	53
I.5.2. Voie de l'oxyde nitrique (NO).....	54
I.5.2.1. Inhibiteurs des phosphodiesterase (PDE5).....	54
I.5.2.2. Activateurs de la guanylate cyclase soluble (GC)	55
I.5.3. Voie de la prostacycline	55
I.5.4. Bloqueurs des canaux calciques	57

I.5.5. Molécules en essais cliniques	57
I.6. Les modèles animaux d’HTAP	58
I.6.1. Modèle induit par la Monocrotaline (MCT) chez le rat	59
I.6.2. Modèle induit par l’hypoxie chronique chez le rat et la souris	60
I.6.3. Modèle induit par le Sugén + hypoxie	61
I.6.4. Modèle d’hypertension pulmonaire sur shunt	61
II. LE MICROBIOTE PULMONAIRE : Généralités, caractérisation et mise en place	63
II.1. Définitions importantes.....	63
II.1.1. Microbiome	63
II.1.2. Microbiote	63
II.1.3. Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) : notion de taxonomie	64
II.1.4. Variant de séquence d'amplicon (ASV)	64
II.1.5. Métagénome	66
II.1.6. Calcul de la diversité alpha du microbiote pulmonaire	66
II.1.6.1. Indice de Shannon	66
II.1.6.2. Indice de Simpson	66
II.2. Origine et caractéristiques du microbiote pulmonaire	66
II.3. Caractérisation du microbiote pulmonaire.....	68
II.3.1. Techniques de prélèvement du microbiote pulmonaire	69
II.3.1.1. Lavage bronchoalvéolaire	69
II.3.1.2. Biopsie chirurgicale pulmonaire	70
II.3.2. Méthodologie d’étude du microbiote pulmonaire	70
II.3.2.1. Séquençage à haut débit : la stratégie globale ou Shotgun	70
II.3.2.2. Approche ciblée : le séquençage de la sous-unité 16S	71
II.3.2.2.1. Technologie PacBio.....	72
II.3.2.2.2. Technologie illumina	72
II.3.2.3. Métagénomique	73
II.3.2.4. Métatranscriptomique	73
II.3.2. Difficultés liées à l’étude du microbiote pulmonaire	74
II.3.3. Description du microbiote pulmonaire	74
II.3.3.1. Composition générale du microbiote pulmonaire	75
II.3.3.2. Description des principaux phyla bactériens pulmonaires chez l’homme	76
II.3.3.2.1. Phylum des Firmicutes	76
II.3.3.2.2. Phylum des Bacteroidetes	77
II.3.3.2.3. Phylum des Actinobacteria	77
II.3.3.2.4. Phylum des Proteobacteria	77
II.4. Mise en place du microbiote pulmonaire	78
II.4.1. Mode d’accouchement	79
II.4.2. Facteurs environnementaux	80
II.4.3. Axe intestin-poumon	81
II.5. Les fonctions connues du microbiote pulmonaire	83
II.5.1. Rôle du microbiote pulmonaire dans l’architecture pulmonaire	83
II.5.2. Rôle de barrière du microbiote pulmonaire	84
II.5.3. Rôle du microbiote pulmonaire dans l’immunité	85
II.5.4. Rôle dans l’éducation du système immunitaire	86
II.6. Les acides gras à chaîne courte (AGCC)	87
II.6.1. Les récepteurs spécifiques des acides gras à chaîne courte	87
II.6.2. Le butyrate	88
II.6.2.1. Impact du butyrate dans la prolifération et la survie cellulaire.....	91
II.6.2.2. Impact du butyrate dans les processus inflammatoires	92
II.7. Microbiote pulmonaire et pathologies respiratoires	92
II.7.1. Microbiote pulmonaire et Asthme	93
II.7.2. Microbiote pulmonaire et Mucoviscidose.....	94

II.7.3. Microbiote pulmonaire et bronchopneumopathie chronique obstructive.....	95
II.8. Impact du microbiote pulmonaire sur le développement de l'HTAP	96
II.9. Thérapies probiotiques et prébiotiques	101
II.9.1. Thérapies probiotiques	102
II.9.2. Thérapies prébiotiques.....	103
II.10. Ciblage des bactéries pathogènes	103
<i>HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS</i>	<i>106</i>
<i>HYPOTHESE DE TRAVAIL</i>	<i>107</i>
<i>RESULTATS</i>	<i>109</i>
<i>I. OBJECTIF 1 : L'ABSENCE DE MICROBIOTE IMPACTE LA STRUCTURE PULMONAIRE POST-NATALE ET L'ARBRE VASCULAIRE PULMONAIRE</i>	<i>110</i>
I.1. Rationnel.....	110
I.2. Objectif.....	110
I.3. Résultats	111
I.4. Manuscrit associé	113
<i>II. OBJECTIF 2 : IMPACT DU MICROBIOTE PULMONAIRE ET DES MÉTABOLITES BACTÉRIENS SUR LE REMODELAGE VASCULAIRE ET L'HTAP</i>	<i>138</i>
II.1. Rationnel	138
II.2. Objectif	139
II.3. Résultats	139
Manuscrits associés.....	142
<i>DISCUSSION.....</i>	<i>213</i>
<i>DISCUSSION GENERALE</i>	<i>214</i>
<i>I. IMPACT DU MICROBIOTE SUR LA STRUCTURE PULMONAIRE POST-NATALE ET L'ARBRE VASCULAIRE PULMONAIRE.....</i>	<i>214</i>
<i>II. EFFET DU SODIUM BUTYRATE IN VIVO ET IN VITRO DANS L'HTAP HUMAINE ET DANS LE MODELE D'HTP INDUITE PAR LA MONOCROTALINE CHEZ LE RAT.....</i>	<i>219</i>
<i>III. ETUDE COMPAREE DU MICROBIOTE INTESTINALE ET DU MICROBIOTE PULMONAIRE DANS LE MODELE D'HTP INDUITE PAR LA MONOCROTALINE CHEZ LE RAT.....</i>	<i>225</i>
<i>CONCLUSION.....</i>	<i>229</i>
<i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</i>	<i>230</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	<i>234</i>

RESUME

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare, chronique et dévastatrice, due à une occlusion progressive des artères pulmonaires distales, avec pour conséquence une augmentation de la résistance vasculaire et de la pression artérielle pulmonaire moyenne, entraînant in fine une insuffisance cardiaque droite et la mort. La découverte des techniques de séquençage à haut débit et l'avènement des outils bio-informatiques ont permis de montrer que le poumon n'est pas un organe stérile comme cela était pensé, mais qu'il serait colonisé par des microorganismes, notamment des bactéries. De nombreuses études ont permis alors d'associer des profils de communautés bactériennes à diverses maladies, notamment des pathologies respiratoires telles que l'asthme, la BPCO et la mucoviscidose. Nous avons émis l'hypothèse que certains métabolites du microbiote pulmonaire associé à l'HTAP pourraient jouer un rôle direct sur les cellules de la paroi vasculaire pulmonaire, et participer au remodelage vasculaire conduisant à l'HTAP. Nous avons montré que les récepteurs de certains métabolites bactériens tels que les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont dérégulés dans l'HTAP. Le butyrate, un AGCC, inhibe la prolifération, la migration et l'inflammation, *in vitro*, dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires. Dans un modèle d'hypertension pulmonaire (HTP) induite par la monocrotaline (MCT), le butyrate améliore les paramètres hémodynamiques et le remodelage vasculaire. Une approche RNAseq a permis d'identifier les cibles du butyrate et de mieux comprendre son mode d'action. Nous avons montré également que le profil des communautés bactériennes était modifié dans l'HTP expérimentale aussi bien dans l'intestin que dans le poumon. Enfin, dans un modèle de rat axénique, nous avons observé en post-natal, une diminution du nombre des alvéoles et une muscularisation des artérioles associés à des infiltrats de cellules lymphoïdes et myéloïdes proliférantes dans les parois bronchiques, alvéolaires et vasculaires, suggérant que l'absence de microbiote influence le développement de l'arbre vasculaire pulmonaire et de la structure alvéolaire. Ces résultats apportent de nouveaux éléments pour étayer le lien entre le microbiote et l'HTAP et pourraient contribuer à l'identification de nouveaux marqueurs bactériens pour améliorer le diagnostic par le dosage de métabolites bactériens circulants et les solutions thérapeutiques ciblées dans l'HTAP, prenant en compte l'écosystème bactérien.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare, chronic and devastating disease, caused by progressive occlusion of the distal pulmonary arteries, resulting in increased vascular resistance and mean pulmonary arterial pressure, ultimately leading to right heart failure and death. The discovery of high-throughput sequencing techniques and the advent of bioinformatics tools made it possible to show that the lung is not a sterile organ as previously thought, but that it is colonized by microorganisms, particularly bacteria. Numerous studies have made it possible to associate bacterial community profiles with various diseases, particularly respiratory pathologies such as asthma, COPD and cystic fibrosis. We hypothesized that certain metabolites of the pulmonary microbiota associated with PAH might play a direct role on the cells of the pulmonary vascular wall, and participate in the vascular remodeling leading to PAH. We have shown that receptors for certain bacterial metabolites such as short chain fatty acids (SCFAs) are deregulated in PAH. Butyrate, a SCFA, inhibits proliferation, migration and inflammation in pulmonary artery smooth muscle cells *in vitro*. In a monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH) model, butyrate improves hemodynamic parameters and vascular remodeling. An RNAseq approach allowed us to identify the targets of butyrate and to better understand its mode of action. We also showed that the profile of bacterial communities was modified in experimental PH in both the intestine and the lung. Finally, in an axenic rat model, we observed postnatal reduction in the number of alveoli and muscularisation of arterioles associated with infiltrates of proliferating lymphoid and myeloid cells in the bronchial, alveolar and vascular walls, suggesting that the absence of microbiota influences the development of the pulmonary vascular tree and alveolar structure. These results provide new evidence to support the link between microbiota and PAH and may contribute to the identification of new bacterial markers to improve diagnosis by measuring circulating bacterial metabolites and targeted therapeutic solutions in PAH, considering the bacterial ecosystem.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

I. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Figure illustrative des anomalies vasculaires pulmonaires présentes dans l'HTAP

Figure 2 : Lésions intinales

Figure 3 : Artère pulmonaire présentant une hypertrophie de la média

Figure 4 : Lésion plexiforme à multiples canaux sinusoidaux

Figure 5 : Dysfonction endothéliale dans l'hypertension pulmonaire et le remodelage vasculaire pulmonaire

Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation BMPR2

Figure 7 : Principales mutations génétiques dans l'hypertension artérielle pulmonaire

Figure 8 : Équilibre (à gauche) et déséquilibre (à droite) entre les voies de signalisation TGF β et BMPRII.

Figure 9 : Remodelage vasculaire médié par l'inflammation dans l'HTAP.

Figure 10 : Trois voies classiques de thérapie ciblée dans la physiopathologie de l'HTAP

Figure 11 : Voies respiratoires supérieures et inférieures chez l'Homme

Figure 12 : Facteurs d'entrée/sortie des anaérobies dans les poumons.

Figure 13 : Comparaison des régions de l'ARN 16S couvertes par Illumina et PacBio

Figure 14 : Représentation schématique de l'abondance et de la diversité selon les microbiotes des voies aériennes supérieures et inférieures en situations physiologiques et pathologiques.

Figure 15 : Principaux phylums bactériens présents dans le poumon sain et densité bactérienne le long du tractus pulmonaire. UFC

Figure 16 : Facteurs influençant le microbiote pulmonaire.

Figure 17 : L'axe intestin-poumon dans l'HTAP

Figure 18 : Voies microbiennes pour la formation du butyrate à partir de glucides, d'acides organiques, de glutamate et de lysine dans les communautés intestinales.

Figure 19 : Rôles des microbiomes respiratoires dans les maladies respiratoires chroniques

II. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des hypertensions pulmonaires

Tableau 2 : Liste des médicaments et toxines associés à l'HTAP

Tableau 3 : Principales valeurs hémodynamiques du cathétérisme cardiaque droit pour le diagnostic de à l'HTAP

Tableau 4 : Etudes de microbiotes dans l'HTAP humaine

Tableau 5 : Etudes de microbiotes dans les modèles animaux d'HTP

LISTE DES ABREVIATIONS

4-PBA	4-Phenylbutyric acid		Endoglin
5-HTR1B	5-Hydroxytryptamine Receptor 1B	eNOS	Nitric Oxide Synthase 3
ActRIIA	Activin A Receptor Type 2A	ERA	Récepteurs de l'endothéline
ACVRL1	Activin A Receptor Like Type	ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ADCY1	Adenylyl cyclase type 1	ET-1	Endothelin-1
ADN	Acide désoxyribonucléique	FDA	Food and Drug Association
AGCC	Acides gras à chaîne courte	FFAR	Free Fatty Acid Receptor 1
Akt	AKT Serine/Threonine Kinase	FGF	Fibroblast Growth Factor
ALK	ALK Receptor Tyrosine Kinase	FMO3	Flavines monooxygénases
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique	FOXO1	Forkhead Box O1
AP-1	Protéine activatrice 1	FXR	Récepteur farnésioïde X
AQP1	Aquaporine1	GATA2	GATA Binding Protein 2
ARN	Acide ribonucléique	GCs	Guanylate cyclase soluble
ATF	Activating Transcription Factor	GDF	Growth Differentiation Factor
ATP13A1	Adenosine Triphosphate 13A1	GMP	Cyclic guanosine monophosphate
BCL2	B-Cell CLL/lymphoma 2	GPR	Récepteur couplé aux protéines
BCL-xL	B-Cell CLL/Lymphoma	GUSB	β -glucuronidase
BMP9	Bone Morphogenetic Protein	Has3	Hyaluronane Synthase 3
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor type 2	HCAR2	Récepteur 2 des acides hydroxycarboxyliques
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive	HDAC	Histone désacétylase
C/EBP β	CCAAT Enhancer Binding Protein Beta	HEK	Human Embryonic Kidney
Ca 2+	Calcium	HIF1	Facteur 1 α inducible par l'hypoxie
CAV1	Caveolin 1	HMGA1	High Mobility Group AT-Hook 1
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand	HMGB1	High Mobility Group Box 1
CD	Cluster of differentiation	HPTEC	Hypertension Pulmonaire Thromboembolique Chronique
CDK	Cyclin Dependent Kinase	HTAP	Hypertension Artérielle Pulmonaire
CE-AP	Cellule Endothéliale d'Artères Pulmonaires	HTP	Hypertension Pulmonaire
CFTR	Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique	HTT	Huntingtin
CML-AP	Cellule Musculaire Lisse d'Artères Pulmonaires	ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires	IFN γ	Interféron gamma
COX	Cyclooxygénases	IgG1	Immunoglobuline G
CUX2	Cut Like Homeobox 2	IL	Interleukin
CXC3L1	C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1	iNOS	Inducible nitric oxide synthase
DC	Débit Cardiaque	IRE1	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3	Jun	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
EDHF	Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium	KCNK3	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3
EFR	Epreuve fonctionnelle respiratoire	KDR	Kinase Insert Domain Receptor
EGF	Platelet Derived Growth Factor Subunit	LBA	Lavage Bronchoalvéolaire
EIF2AK4	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4	LPS	Lipopolysaccharide
EndoMT	Transition Endothéliale Mésenchymateuse	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP-1	C-C Motif Chemokine Ligand 2	ROCK	Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
MCT	Monocrotaline	ROS	Espèces réactives de l'oxygène
MEC	Matrice Extracellulaire	RVP	Pression du Ventricule Droit
mmHg	Millimètres de Mercure	SERT	Sérotonine
MMP	Métalloprotéinases	SGS	Séquençage de deuxième génération
MPOC	La maladie pulmonaire obstructive chronique	SIRT	Sirtuin
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase	SLPI	Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor
MVO	Maladie Veino-Occlusive pulmonaire	Slug	Snail Family Transcriptional Repressor 2
NF-κB	Facteur nucléaire-kappa B	SMAD9	SMAD Family Member 9
NGF	Nerve Growth Factor	SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
NGS	Next Generation Sequencing	SNCA	Synuclein Alpha
NK	Natural Killer	SOD2	Superoxyde dismutases
NLRP3	NLR Family Pyrin Domain Containing 3	SOX17	SRY-Box Transcription Factor 17
NLRP3	Domaine pyrine de la famille des récepteurs nod-like contenant 3	STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
NO	Monoxyde d'Azote	Su/Hx	Sugen-hypoxie
Nox-1	NADPH oxydase-1	TASK1	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3
Nrf2	Facteur nucléaire érythroïde 2	TBX4	T-Box Transcription Factor 4
NRP1	Neuropiline 1	TCTP	Protéine Tumorale Contrôlée par Translation
NTP42	Antagonist of the thromboxane A2 receptor	TGF-β	Transforming Growth Factor-Beta
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	THBS1	Thrombospondine
ONT	Oxford Nanopore Technologies	TIMP	TIMP Metallopeptidase Inhibitor
OTU	Unité Taxonomique Opérationnelle	TLR	Toll Like Receptor
P2ry1	Purinergic Receptor P2Y1	TM6	Test de marche de 6 minutes
PACP	Pression Artérielle Capillaire Pulmonaire	TMAO	N-oxyde de triméthylamine
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns	TNF	Tumor Necrosis Factor
PAPm	Pression Artérielle Pulmonaire moyenne	TPT1	Tumor Protein, Translationally-Controlled 1
PAPO	Pression Artérielle pulmonaire d'Occlusion	TWIST1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor Subunit	TXA2	Thromboxane A2
PD-L1	Programmed death-ligand 1	UFC	Unités formant colonies
PERK	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3	VCAM1	Molécule d'Adhésion Cellulaire Vasculaire-1
PGI2	Prostaglandine	VD	Ventricule Droit
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	VE-cadhérine	Vascular Epithelium cadherin
PKC	Protein Kinase C	VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
PLC	Phospholipase C	VezF1	Vascular Endothelial Zinc Finger 1
PTE	Thromboendartériectomie Pulmonaire	XBP-1	X-Box Binding Protein 1
Ras	KRAS Proto-Oncogene, GTPase	α-SMA	Actine musculaire lisse α
RhoA	Ras Homolog Family Member A		

AVANT-PROPOS

Les microorganismes ont toujours été considérés comme des organismes étrangers susceptibles de causer des maladies chez leurs hôtes. Cette idée, née de la « théorie des germes ou théorie microbienne » de **Louis Pasteur en 1878**, indiquant que de nombreuses maladies causées par les micro-organismes, est le facteur clé de cette pensée négative. Cette théorie a été considérée comme un élément fondamental de la médecine moderne de l'immunologie et de la microbiologie clinique. Ainsi, il fallait absolument lutter par tous les moyens contre ces agents pathogènes. Cette lutte aboutit alors à la création du premier vaccin humain contre la rage par **Louis Pasteur en 1885** et à l'invention des antibiotiques pour l'élimination de ces micro-organismes.

En 1929, Alexander Fleming publie dans le *British Journal of Experimental Pathology*, sa découverte inattendue montrant que des moisissures (*Penicillium natatum*) s'étant développées sur des boîtes de pétri destinées à faire pousser des bactéries ont en même temps inhibé la croissance de ces dernières. De façon inattendue, ces moisissures ont synthétisé une substance antibactérienne responsable de cette inhibition de croissance. C'est la découverte de la « pénicilline », considérée comme une des découvertes scientifiques les plus importantes du millénaire et qui a permis de sauver de nombreuses vies.

Ajouté à ces découvertes majeures, les progrès scientifiques et technologiques récents de la recherche et de la médecine ont contribué à révolutionner cette vision négative attribuée à ces micro-organismes. Ainsi, l'apparition des techniques de séquençage à haut débit ont fourni des résultats scientifiques montrant que non seulement tous les micro-organismes ne sont pas des pathogènes mais que certains sont utiles à la santé de l'homme. On parle de l'existence d'une vraie relation symbiotique entre l'hôte et son microbiote. Un déséquilibre de cette relation pourrait être à la base d'une dysbiose pouvant jouer un rôle important dans certaines pathologies. La première étude de séquençage du microbiome est réalisée sur le microbiote intestinal en 2015. Elle a permis d'analyser des échantillons de selles de 124 sujets européens et de caractériser plus de 3,3 millions de gènes appartenant à environ 1 000 espèces différentes. Le microbiote intestinal humain est composé approximativement de 10^{14} bactéries, auxquelles il faudrait ajouter les virus et les champignons, le tout représentant une masse d'environ un kilogramme. Cette étude a ouvert la voie sur la caractérisation d'autres microbiotes tels que le microbiote des voies respiratoires, le microbiote vaginal, le microbiote cutané, etc.

Ces études ont permis d'établir que la santé de l'homme dépend directement des écosystèmes microbiens faisant partie intégrante de notre corps. Par ailleurs, de nombreuses études ont

permis d'associer des profils de communautés microbiennes de l'écosystème bactérien à diverses pathologies, notamment des pathologies respiratoires telles que l'asthme, la mucoviscidose, la BPCO, etc. Dans ces travaux, l'accent a été mis sur le rôle bénéfique du microbiote des voies respiratoires et ses métabolites dans l'immunité innée et adaptative, dans la protection contre l'installation de nouveaux pathogènes à travers sa fonction de flore barrière et son influence sur l'architecture du poumon.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle du microbiote pulmonaire dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Contrairement à l'hypertension systémique, l'HTAP est une maladie rare, mortelle et incurable qui se traduit par une élévation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires de petits calibres car celles-ci sont partiellement ou totalement obstruées à la suite de l'épaississement de leurs parois. Elle aboutit *in fine* à une insuffisance cardiaque due à une incapacité du cœur droit à assurer son rôle de pompe pour envoyer le sang dans les poumons afin d'être réoxygéné pour répondre aux besoins de l'organisme. Cette pathologie est caractérisée par un phénomène de remodelage important des petites artères pulmonaires avec une prolifération des cellules vasculaires pulmonaires et une signature inflammatoire. Les traitements actuels, non curatifs et essentiellement vasodilatateurs vont cibler la vasoconstriction. Toutes les connaissances à ce jour suggèrent que pour mieux traiter cette maladie, il faut s'attaquer à la cause principale qui est le remodelage vasculaire pulmonaire. Le constat aujourd'hui est qu'aucun de ces traitements ne prend en compte le rôle du microbiote pulmonaire et ses métabolites dans la lutte contre le remodelage vasculaire pulmonaire et l'HTAP.

Très peu d'études ont été réalisées sur le microbiote pulmonaire du fait de la difficulté liée à l'impossibilité de prélèvement du parenchyme pulmonaire chez des personnes saines. La grande majorité des études étiquetées « microbiote pulmonaires » sont basées sur l'étude du microbiote oropharyngé, ou des lavages broncho-alvéolaires. Les connaissances issues du microbiote intestinal, qui reste de très loin le plus important et le plus étudié, montrent une dysbiose dans certaines pathologies respiratoires avec une implication de certains genres et métabolites bactériens dans la modulation des processus d'inflammation, d'apoptose, de prolifération et de migration cellulaire. Ces processus étant des mécanismes clés de la physiopathologie de l'HTAP, mes travaux ont porté sur le rôle de certains métabolites bactériens et plus généralement du microbiote pulmonaire au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire.

INTRODUCTION

I. HYPERTENSION PULMONAIRE (HTP) ET HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE (HTAP)

I.1. Définition et classification

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie grave qui se traduit par une pression élevée dans la circulation pulmonaire. Elle regroupe un panel de pathologies cardio-pulmonaires caractérisées par une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) pouvant entraîner une défaillance du cœur droit. La classification de l'HTP a évolué dans le temps depuis le premier symposium mondial de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à Genève en 1979. Ce symposium a posé les bases du diagnostic de l'HTP mesurée par cathétérisme cardiaque droit avec une PAPm ≥ 25 mm Hg. Cette valeur a évolué dans le temps et aujourd'hui, une PAPm >20 mm Hg au repos est considérée comme anormale et correspond à la définition hémodynamique de l'HTP.

Une classification basée sur les caractéristiques hémodynamiques et physiopathologiques ainsi que les traitements et la prise en charge des HTP permet de les regrouper dans différentes classes (Tableau 1) pour créer des groupes homogènes afin de mieux standardiser les essais cliniques et les prises en charge médicales. Ainsi, les HTP sont classées en cinq groupes.

La Résistance Vasculaire Pulmonaire (RVP) est un paramètre fondamental et permet la distinction entre l'hypertension systémique et l'HTAP. Elle s'obtient par la formule :

$$RVP = [(PAPm - Pression Artérielle Capillaire Pulmonaire (PACP))/Débit Cardiaque (DC)]$$

<p>GROUP 1 Pulmonary arterial hypertension (PAH)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1.1 Idiopathic <ul style="list-style-type: none"> 1.1.1 Non-responders at vasoreactivity testing 1.1.2 Acute responders at vasoreactivity testing 1.2 Heritable^a 1.3 Associated with drugs and toxins^a 1.4 Associated with: <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1 Connective tissue disease 1.4.2 HIV infection 1.4.3 Portal hypertension 1.4.4 Congenital heart disease 1.4.5 Schistosomiasis 1.5 PAH with features of venous/capillary (PVOD/PCH) involvement 1.6 Persistent PH of the newborn
<p>GROUP 2 PH associated with left heart disease</p> <ul style="list-style-type: none"> 2.1 Heart failure: <ul style="list-style-type: none"> 2.1.1 with preserved ejection fraction 2.1.2 with reduced or mildly reduced ejection fraction^b 2.2 Valvular heart disease 2.3 Congenital/acquired cardiovascular conditions leading to post-capillary PH
<p>GROUP 3 PH associated with lung diseases and/or hypoxia</p> <ul style="list-style-type: none"> 3.1 Obstructive lung disease or emphysema 3.2 Restrictive lung disease 3.3 Lung disease with mixed restrictive/obstructive pattern 3.4 Hypoventilation syndromes 3.5 Hypoxia without lung disease (e.g. high altitude) 3.6 Developmental lung disorders
<p>GROUP 4 PH associated with pulmonary artery obstructions</p> <ul style="list-style-type: none"> 4.1 Chronic thrombo-embolic PH 4.2 Other pulmonary artery obstructions^c
<p>GROUP 5 PH with unclear and/or multifactorial mechanisms</p> <ul style="list-style-type: none"> 5.1 Haematological disorders^d 5.2 Systemic disorders^e 5.3 Metabolic disorders^f 5.4 Chronic renal failure with or without haemodialysis 5.5 Pulmonary tumour thrombotic microangiopathy 5.6 Fibrosing mediastinitis

Tableau 1 : Classification des hypertensions pulmonaires (Humbert, M. et al. 2022 ESC/ERS Guidelines)¹

I.1.1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

L'hypertension artérielle pulmonaire est une maladie rare et incurable qui va toucher essentiellement les artères de petits calibres entraînant ainsi une augmentation progressive des résistances artérielles pulmonaires et une défaillance du cœur droit. Le diagnostic de l'HTAP se fait par cathétérisme cardiaque droit. Cet acte chirurgical, hautement invasif, permet de mesurer la PAPm supérieure à 20 mm Hg au repos. Cette pression est associée à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) supérieure à 2 unités de Wood et une pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) inférieure ou égale à 15 mm Hg. L'HTAP appartient au groupe 1 des hypertensions pulmonaires et comprend 6 sous-groupes.

- HTAP idiopathique (HTAPi)

Ce sont des maladies pour lesquelles aucune cause n'est retrouvée. Ainsi, elles se définissent comme des HTAP qui ne sont ni la conséquence ni la complication d'une autre pathologie. Leurs prises en charge peuvent souvent être compliquées vu que l'étiologie de la maladie n'est pas totalement maîtrisée.

- HTAP héritable (HTAPh)

De nombreuses mutations génétiques ont été associées au développement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Des mutations liées au gène *BMPR2* sont les plus fréquentes dans l'HTAP héritable. D'autres mutations comme celles des gènes *ACVRL1*, *SMAD9*, *BMP9*, *KCNK3*, *CAV1*, *TBX4*, *ATP13A1*, *SOX17* ont été décrites dans l'HTAP. Dans le cas de la mutation *BMPR2*, le mode de transmission génétique est autosomique dominante avec une pénétrance incomplète estimée à 20 %.

- HTAP associée à la prise de drogues ou de toxines

De nombreuses études ont montré que plusieurs médicaments ou drogues sont ou pourraient être des facteurs de risque pour le développement de l'HTAP (Tableau 2). Ce tableau indique la liste de quelques médicaments et drogues associés à la survenue de l'HTAP.

Definite association	Possible association
Aminorex	Alkylating agents (cyclophosphamide, mitomycin C) ^a
Benfluorex	Amphetamines
Dasatinib	Bosutinib
Dexfenfluramine	Cocaine
Fenfluramine	Diazoxide
Methamphetamines	Direct-acting antiviral agents against hepatitis C virus (sofosbuvir)
Toxic rapeseed oil	Indirubin (Chinese herb Qing-Dai)
	Interferon alpha and beta
	Leflunomide
	L-tryptophan
	Phenylpropanolamine
	Ponatinib
	Selective proteasome inhibitors (carfilzomib)
	Solvents (trichloroethylene) ^a
	St John's Wort

Tableau 2 : Liste des médicaments et toxines associés à l'HTAP

(Humbert, M. et al. 2022 ESC/ERS Guidelines)¹

- HTAP associée à diverses maladies

Ce sont des HTAP liées à d'autres maladies telles qu'une connectivite, une infection au VIH, une hypertension portale, une cardiopathie congénitale ou une schistosomiase.

- HTAP chez les nouveau-nés

L'hypertension artérielle pulmonaire du nouveau-né est une forme grave d'HTAP qui est présente uniquement à la naissance. Elle se caractérise par une vasoconstriction des artères pulmonaires qui persiste après la naissance. Ce maintien de la vasoconstriction après la naissance va entraîner une réduction considérable du débit sanguin et par conséquent du taux d'oxygène dans le sang. Environ 10 à 60 % des nouveau-nés affectés décèdent et près de 25 % des enfants qui survivent présentent une capacité limitée des activités physiques qui se traduit par des retards de développement, des problèmes auditifs, des handicaps fonctionnels, etc. Cela peut varier en fonction des études et des centres de santé. La cause principale reste une absence de dilatation des vaisseaux sanguins qui alimente le poumon en sang. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence de dilatation des vaisseaux :

- Syndrome d'inhalation méconiale ;
- Syndrome de détresse respiratoire ;
- Septicémie du nouveau-né ;
- Collapsus du poumon.

- HTAP avec une atteinte veineuse pulmonaire : maladie veino-occlusive (MVO)

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO) est une forme rare d'hypertension pulmonaire (PH) caractérisée par un remodelage préférentiel des veinules et veines septales pulmonaires ². Elle peut être héritable avec une mutation autosomique récessive du gène *EIF2AK4*. Elle peut être également secondaire à une exposition chronique à certains solvants organiques comme le trichloréthylène ou à la prise de certains traitements impliquant des chimiothérapies (cyclophosphamide ou mitomycine C) chez les patients avec des cancers. D'autres facteurs de risque comme l'exposition au tabac et des MVO associées à des troubles inflammatoires tels que la sarcoïdose, la granulomatose à cellules de Langerhans et la thyroïdite de Hashimoto ont été rapportés ².

I.1.2. Hypertension pulmonaire associée à des maladies du cœur gauche

Elle représente la cause la plus fréquente d'hypertension pulmonaire. Ces patients sont classés dans le groupe 2 (hypertension postcapillaire) de la classification des hypertensions pulmonaires. Lors du cathétérisme cardiaque, les patients atteints d'HTP associée à une maladie du cœur gauche ont une pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) > 15 mm Hg en association avec une PAPm > 20 mm Hg. L'augmentation de la PAPm est en relation avec une augmentation de la pression auriculaire gauche.

I.1.3. Hypertension pulmonaire associée à des maladies pulmonaires et/ou à l'hypoxie

Il s'agit du groupe 3 des HTP. C'est la plus fréquente des hypertensions pulmonaires précapillaires, en raison de la très forte prévalence de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). C'est une HTP résultant généralement d'une hypoxie alvéolaire qui produit un remodelage vasculaire pulmonaire distal qui va engendrer une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire.

I.1.4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique

L'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (HPTEC) est une maladie rare causée par l'obstruction des grosses artères pulmonaires par des embolies aiguës et récurrentes. L'organisation des caillots sanguins en tissu fibreux est associée à la disparition de l'intima et à une infiltration de la média du vaisseau artériel ^{3,4}. Elle peut être initiée ou aggravée par des anomalies de la cascade de coagulation, des cellules endothéliales ou des plaquettes, qui interagissent toutes dans le processus de coagulation. La conséquence est une augmentation de

la résistance vasculaire pulmonaire entraînant une hypertension pulmonaire (HTP) et une insuffisance cardiaque droite progressive. La thromboendartériectomie pulmonaire (PTE) est le traitement de choix de la maladie pulmonaire thromboembolique chronique ⁴.

I.1.5. Hypertension pulmonaire d'étiologies indéfinies ou multifactorielles

Ce groupe 5 de la classification comprend l'ensemble des pathologies qui pourraient éventuellement être associées au développement d'une HTP dont l'étiologie reste incertaine ou pas clairement maîtrisée telles que les maladies métaboliques et les maladies hématologiques.

I.2. Histopathologie vasculaire dans l'HTAP

Les patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire présentent un ensemble de lésions pathologiques uniques dans le système vasculaire pulmonaire : des lésions plexiformes, une hypertrophie de la média et un épaissement de l'adventice. Les lésions caractéristiques de l'HTAP sont le plus souvent localisées au niveau des parties distales du lit vasculaire pulmonaire comme le montre la (Figure 1).

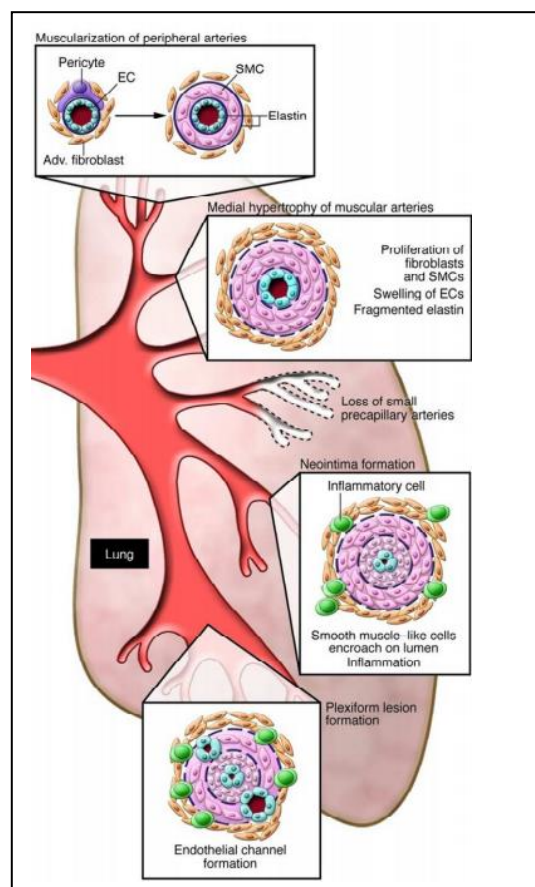


Figure 1 : Figure illustrative des anomalies vasculaires pulmonaires présentes dans l'HTAP : musculation des artères pré-capillaires distales,

hypertrophie de la média des grosses artères pulmonaires, raréfaction des petites artères pré-capillaires distales, formation néo-intimale occlusive et formation de lésions plexiformes (Rabinovitch M. 2012)

I.2.1. Lésions intimes

Les lésions fibrotiques de la couche intimale sont assez présentes dans l'HTAP. L'épaississement de l'intima est le résultat de la prolifération et du recrutement de plusieurs types cellulaires tels que les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules du tissu conjonctif et

aussi des dépôts de collagène. Cette prolifération pourrait être déclenchée par des facteurs de croissance. Cet épaississement peut être laminaire concentrique (bulbe d'oignon), excentrique ou non laminaire concentrique ⁵ (figure2). La fibrose intimale touche surtout les artères ayant un diamètre de l'ordre de 100 à 200µm. La formation d'une couche de myofibroblastes et de matrice extracellulaire entre l'endothélium et la néo-intima est une des caractéristiques de la forme sévère de la maladie ⁵.



Figure 2 : Lésions intimales

À gauche : fibrose laminaire concentrique de l'intima (lésion dite pelure d'oignon).

À droite : fibrose concentrique non laminaire présentant un élargissement plutôt lâche de l'intima (dite néo-intima)

(Ghigna et al 2019) ⁶

I.2.1. Lésions médiales

L'hypertrophie médiale est observée dans toutes les sous-classes d'HTAP. Contrairement aux échantillons de contrôles, on observe chez ces patients une muscularisation importante des artères de petit calibre et une hypertrophie de la média (Figure 3).

Ces deux phénomènes sont dus à une prolifération anormale et à une résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires. Ce qui aboutit à la réduction de la lumière des artères avec pour conséquence une augmentation des PAPm et des RVP. L'hypertrophie de la couche médiale peut être considérée comme un événement précoce et même réversible comme cela a été montré dans l'HTP par hypoxie en haute altitude.

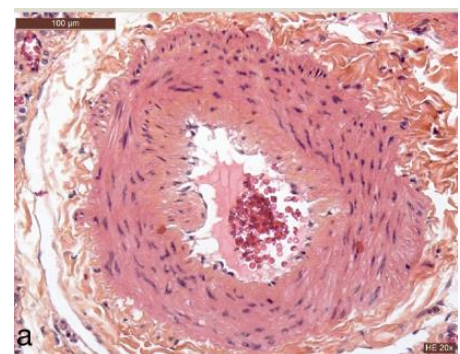


Figure 3 : Artère pulmonaire présentant une hypertrophie de la média

(Ghigna et al 2019) ⁶

I.2.1. Lésions plexiformes

La présence de lésions plexiformes ou lésions complexes est une caractéristique principale d'une HTAP sévère. Ce sont des lésions prolifératives artérielles pulmonaires complexes et désorganisées qui consistent en un réseau de canaux endothéliaux tapissés de myofibroblastes, de cellules musculaires lisses et d'une matrice de tissu conjonctif ⁷ (Figure 4). Les lésions plexiformes contiennent une fréquence importante de thrombi de fibrine et des plaquettes et sont souvent localisées à un point de ramification artérielle, ou à l'origine d'une artère surnuméraire ⁸. Les cellules endothéliales retrouvées dans les lésions plexiformes expriment le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et ses récepteurs, et on pense que les lésions résultent d'une angiogenèse désordonnée attribuable à une prolifération endothéliale monoclonale autonome ⁹. Une autre interprétation possible est la compensation par une recanalisation des lésions occluses ⁶.

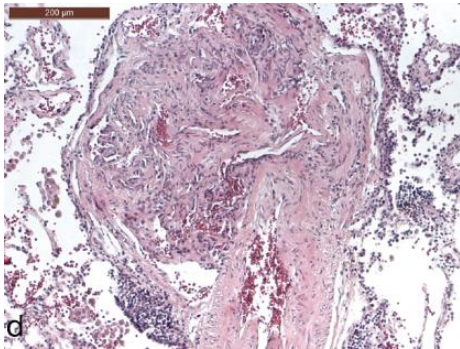


Figure 4 : Lésion plexiforme à multiples canaux sinusoïdaux (Chigna et al 2019) ⁶

I.3. Physiopathologie de l'HTAP

L'hypertension artérielle est une maladie rare et incurable. En France, sa prévalence est estimée à 6 cas par million d'habitants pour l'HTAP idiopathique et 15 cas par million d'habitants pour les HTAP associées. De nombreuses études réalisées *in vitro* sur les différents types cellulaires pulmonaires impliqués dans la pathologie de l'HTAP et sur ses modèles expérimentaux ont permis de comprendre des mécanismes clés de cette maladie et la mise au point de plusieurs médicaments pouvant cibler certaines dysfonctions physiopathologiques.

I.3.1. Mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de l'HTAP

L'une des caractéristiques principales de l'HTAP est le remodelage vasculaire pulmonaire qui est dû à une prolifération anormale et une résistance à l'apoptose des cellules du lit vasculaire.

Ce remodelage implique plusieurs types cellulaires du lit pulmonaires et des cellules infiltrantes de types inflammatoire, lymphoïdes et myéloïdes. Cependant, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules immunitaires restent les plus importantes et les plus décrites dans ce phénomène.

I.3.1.1. Dysfonction des cellules endothéliales (CE)

Dans les conditions normales, l'endothélium est dans un état quiescent et génétiquement stable. Les cellules endothéliales (CE) tapissent l'intérieur des vaisseaux en formant une couche épaisse en contact direct avec le sang. Lorsqu'il est activé, l'endothélium sécrète des facteurs de croissance et cytokines qui affectent la prolifération des CE, des cellules musculaires lisses (CML), l'apoptose, la coagulation et la production de cellules inflammatoires¹⁰. De nombreuses études ont mis en évidence une dysfonction des CE chez les patients atteints d'HTAP ainsi que l'implication d'autres types cellulaires mentionnés plus haut. Les CE restent importantes dans l'initiation et la progression de l'HTAP même si le lien de cause à effet reste difficile à démontrer du fait du dépistage tardif de l'HTAP chez l'homme et de la complexité des mécanismes responsables de cette pathologie. Des études réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires, *in vivo* dans des modèles d'hypertension pulmonaire de rats et de souris et sur du tissu pulmonaire de patients HTAP, montrent qu'elles jouent un rôle fondamental dans plusieurs processus physiopathologiques tels que la vasoconstriction, l'inflammation, la coagulation, la dérégulation métabolique et le stress oxydatif, ainsi que sur la viabilité, la croissance et la différenciation cellulaire^{10,11} (figure 5). Ainsi, de nombreuses caractéristiques de l'HTAP sont les conséquences d'une signalisation impliquant la dysfonction des CE. Ces caractéristiques comprennent l'inflammation pulmonaire et la coagulation, le stress oxydatif/nitratif, la viabilité altérée des cellules vasculaires (par exemple, la résistance à l'apoptose), la prolifération, le changement métabolique et l'accumulation de cellules inflammatoires et de fibroblastes^{10,11}.

Dans l'HTAPi, on observe une augmentation importante du nombre de CE proliférantes et une diminution du nombre de CE apoptotiques dans les artères pulmonaires distales^{11,14}. Les mêmes constats ont été faits, *in vitro*, avec des CE pulmonaires de patients HTAPi présentant une prolifération accrue et une sensibilité réduite à l'induction de l'apoptose avec des augmentations marquées des facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL et des niveaux de phosphorylation extracellulaire régulée par le signal (ERK)1 /2 par rapport aux témoins¹⁴. Cette prolifération importante des CE dans les stades avancés de l'HTAP est un élément essentiel conduisant au remodelage vasculaire pulmonaire¹⁵⁻¹⁸. Plusieurs voies de signalisation ont été associées à ce

phénomène. Ainsi, plusieurs médiateurs de la prolifération et de la migration produits en excès par les CE ont été identifiés dans l'HTAP. L'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et de son récepteur VEGF receptor 2 (VEGFR2) est augmentée dans les CE des lésions plexiformes des patients HTAPI. De plus, les taux plasmatiques de VEGF sont élevés chez les patients atteints d'HTP¹⁹. Or il est connu que le VEGF produit par les CE induit la migration et la prolifération des CML. Il a été montré, par ailleurs, que les CE apoptotiques libèrent le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF-beta1) et du VEGF qui induisent la prolifération des CML chez lesquelles l'on note également la présence de VEGFR²⁰. Ainsi, la mort des CE induite par la contrainte de cisaillement (shear stress) entraîne la production de facteurs de croissance, en particulier le TGF-beta1 qui active la prolifération des CML. Il est également décrit que le VEGF stimule indirectement la prolifération et la migration des CML par la modulation du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2) et du TGF-beta1 libérés par les CE²¹. La protéine tumorale TPT1, un puissant facteur anti-apoptotique est impliquée dans la transformation des cellules malignes. La TPT1 est libérée par les CE en apoptose dans des nano vésicules apoptotiques, qui sont absorbées par les CML induisant directement la résistance à l'apoptose des CML et la dérégulation de la croissance¹¹.

Les CEs jouent également un rôle important dans la synthèse de l'endothéline 1 qui est un acteur clé dans le processus de remodelage vasculaire de l'HTAP et qui constitue une des trois voies de traitement dans cette maladie. En effet, les cellules de patients HTAP présentent une surexpression de la synthèse de l'ET-1²² qui va réguler la production de collagène qui participent au remodelage.

Les mutations de perte de fonction de la cavéoline-1 (*CAVI*) sont l'une des causes héritables identifiées dans l'HTAP. Chez les patients HTAP, l'expression de la *CAV1* est nettement diminuée dans les CE vasculaires pulmonaires. In vitro, le traitement par Cavtrin, un peptide mimétique de *CAV1*, inhibe la prolifération des CE et favorise l'apoptose alors que le déficit en *CAV1* induit la prolifération des CE²³.

Les cytokines pro-inflammatoires pourraient activer la prolifération des CML via la dysfonction endothéliale conduisant ainsi à la progression du remodelage vasculaire pulmonaire et de l'HTAP. Des données suggèrent que *TNF- α* joue un rôle clé dans l'induction de la dysfonction endothéliale par la diminution d'un vasorelaxant, le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*EDHF*). Les médiateurs pro-inflammatoires pourraient inhiber la formation de l'*EDHF* dans les artères isolées²⁴. Ainsi, une diminution de la formation d'*EDHF* qui est impliqué dans l'induction de la relaxation peut contribuer au dysfonctionnement endothélial. Le *TNF- α* réduit la demi-vie de l'ARNm codant pour la *NO* synthase endothéliale²⁴, un autre

vasorelaxant. En effet, les médiateurs pro-inflammatoires induisent la diminution de l'expression de la NO synthase dans les cultures de cellules endothéliales et de l'expression des enzymes du cytochrome P450, qui sont tous deux des candidats probables favorisant la synthèse du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*EDHF*)²⁴. On observe également un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales pulmonaires caractérisé par une augmentation de l'expression de surface de la sélectine E, ICAM1 et VCAM1 ainsi qu'une libération excessive de diverses cytokines et chimiokines clés dans l'HTAP²⁵.

L'endothélium passe à un état activé qui est caractérisé par des changements dans le métabolisme cellulaire, un dysfonctionnement de la CE et un remodelage vasculaire pulmonaire lors d'une lésion ou lors d'une stimulation de ce dernier^{26,27}. Dans les HTP avancées, les altérations métaboliques des cellules endothéliales favorisent une prolifération excessive ainsi que la survie des cellules vasculaires et une angiogenèse accrue^{26,28}. Les CE isolées des lésions vasculaires chez les patients atteints d'HTAP ont un phénotype hyperprolifératif et résistant à l'apoptose qui est soutenu par un changement métabolique vers la glycolyse, des changements dans la phosphorylation oxydative et une augmentation de la glutaminolyse^{17,29}.

Une Transition endothéliale mésenchymateuse (EndoMT) est également observée dans les lésions vasculaires pulmonaires des patients HTAP. L'EndoMT est un phénomène qui permet aux cellules endothéliales d'acquérir un phénotype mésenchymateux qui s'accompagne d'une perte de marqueurs endothéliaux et d'une augmentation des marqueurs mésenchymateux. De plus, les CE perdent le contact cellule-cellule, modifient leur morphologie et adoptent un phénotype hautement migrateur et invasif, perdant ainsi les caractéristiques d'un endothélium sain^{30,31}. Chez les patients HTAP et dans les modèles expérimentaux d'HTP, les conséquences de l'EndoMT se manifeste dans les poumons à travers des niveaux élevés d' α -SMA, de phospho-vimentine et VE-cadhérine^{32,33}. De plus, *TWIST1*, qui est un facteur de transcription clé dans l'induction d'EndoMT, ainsi que la P-Vimentine sont fortement exprimés dans les poumons d'HTAP humains par rapport aux poumons sains³².

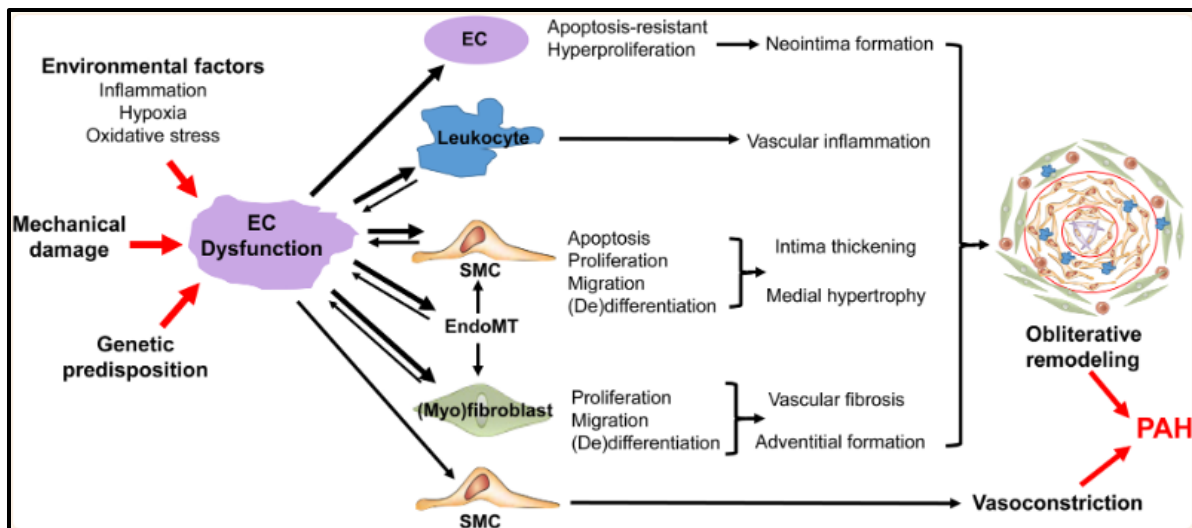


Figure 5 : Dysfonction endothéliale dans l’hypertension pulmonaire et le remodelage vasculaire pulmonaire.

(Evans et al 2021)¹¹

I.3.1.2. Dysfonction des cellules musculaires lisses (CML) artérielles pulmonaires

Avec les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses d’artères pulmonaires (CML-AP) sont les principales cellules de la média des artères pulmonaires. Le remodelage vasculaire identifié dans l’HTAP est en partie dû à la survenue de plusieurs anomalies observées dans les CML-AP. Ces anomalies sont déclenchées par la dysfonction des cellules endothéliales et la perte de la barrière endothéliale. Au cours de cette dysfonction, l’endothélium activé sécrète des facteurs de croissance et des cytokines qui affectent la prolifération et la migration des CE, mais également des CML. En effet, les CML se trouvent exposées aux facteurs de croissance libérés en excès par l’endothélium défaillant. Ainsi, on observe la prolifération et la migration exagérées et la résistance à l’apoptose des CML-AP suite à leur surexposition à des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*PDGF*), le facteur de croissance épidermique (*EGF*), le facteur de croissance des fibroblastes (*FGF*), le facteur de croissance des nerfs (*NGF*)³⁴. L’expression du PDGF et des récepteurs du PDGF est augmentée dans les artères pulmonaires des patients souffrant d’HTAP. En effet, le PDGF induit la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de l’artère pulmonaire dans l’HTAP³⁵. Le PDGF, le mitogène le plus puissant pour les CML, provoque une augmentation de la prolifération cellulaire et le glissement vers la voie métabolique anormale qui constitue l’effet Warburg dans l’état de prolifération des CML-AP. En effet, contrairement aux cellules saines chez lesquelles les molécules d’ATP proviennent majoritairement de la phosphorylation oxydative mitochondriale, les cellules vasculaires pulmonaires dans l’HTAP vont produire cet

ATP via la glycolyse aérobie. La glycolyse aérobie ayant un plus faible rendement que la phosphorylation oxydative en termes de production de molécules d'ATP, les cellules vasculaires pulmonaires anormales dans l'HTAP consomment des taux plus importants de glucose pour atteindre le même niveau d'énergie produit par une cellule saine ³⁶. Il joue un rôle important dans l'homéostasie intracellulaire du Ca^{2+} dans les CML-AP et dans le remodelage artériel pulmonaire ainsi que le développement de l'HTAP ³⁷. Des analyses fonctionnelles ont révélé que le miR-339 pourrait inhiber la prolifération des CML-AP induite par FGF2 ³⁸.

Un autre élément à prendre en compte dans l'hyperprolifération des CML-AP est le déséquilibre de la balance *BMPR2/TGFβ*. Dans la circulation pulmonaire, *BMPR2* inhibe la prolifération des CML, principalement dans les petites artérioles pulmonaires. Lorsqu'il est muté, le gène *BMPR2* augmente la prédisposition au développement d'une HTAP. Par conséquent, une perte d'homéostasie par une diminution ou la perte de l'expression et de la signalisation de *BMPR2* et/ou une augmentation de l'expression et de la signalisation du TGFβ contribuerait à la pathogenèse de l'HTAP par une altération de la signalisation des Smad et l'activation des voies de signalisation des *MAPK* ³⁹. *TGFβ* est impliqué dans l'inflammation, l'angiogenèse, la cicatrisation et la fonction des cellules immunitaires, et exerce des effets puissants sur la prolifération des CML, la synthèse de la matrice extracellulaire et la différenciation *in vitro* ⁴⁰. D'autres études ont montré le rôle des CML dans la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC). En effet, les CML-AP de patients HTAP synthétisent de manière plus importante de nombreux composés de la MEC comme le collagène, la ténascine, la fibronectine et participent ainsi, de manière active, au remodelage artériel pulmonaire dans la maladie ⁴¹.

I.3.1.3. Dysfonction des fibroblastes

Le remodelage artériel pulmonaire qui est la caractéristique principale de l'HTAP est aussi caractérisé par une prolifération excessive, une migration et une activation pro-inflammatoire des fibroblastes de l'adventice ^{42,43}. En effet, les fibroblastes isolés des artères pulmonaires des patients atteints d'HTAP présentent un phénotype hyperproliférant, résistant à l'apoptose, pro-inflammatoire, marqué par la production de molécules inflammatoires et l'expression de marqueurs myofibroblastiques. Les fibroblastes mobilisent les macrophages de façon paracrine par l'intermédiaire d'*IL6* et de *STAT3*, de *HIF1*, et de la signalisation C/EBPβ pour réguler l'expression de gènes tels que *HIF1 alpha*, *VEGF*, *PIM1* et *NFACT2* qui sont impliqués dans l'inflammation chronique et le remodelage tissulaire ⁴². Ces changements sont associés à des modifications épigénétiques qui se traduisent par une augmentation de l'activité des HDAC et une diminution de l'expression du miR124 ⁴³.

I.3.1.4. Dysfonction des cellules immunitaires

D'autres types cellulaires sont impliqués dans le remodelage vasculaire observé dans l'HTAP. La dysfonction immunitaire est un facteur essentiel de l'inflammation pulmonaire périvasculaire et de l'évolution pathologique de l'HTAP. Dans les modèles d'HTAP, l'inflammation est importante pour l'initiation et le maintien du remodelage vasculaire, et le ciblage thérapeutique de l'inflammation dans ces modèles atténue le développement de l'HTAP. Le remodelage peut être associé à un recrutement et à une mobilisation de cellules immunitaires innées ou adaptatives de type myéloïde et lymphoïde. Il a été décrit une accumulation de follicules lymphoïdes à l'intérieur et autour de la paroi des vaisseaux pulmonaires remodelés et à proximité des lésions plexiformes ⁴⁴, suggérant une néogénèse lymphoïde. Des infiltrats de cellules immunitaires, composés principalement de lymphocytes T et B, de macrophages, de mastocytes et de cellules dendritiques, sont présents autour des artères pulmonaires remodelées chez les patients HTAP ⁴⁵. Les lymphocytes B jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de l'HTAP, non seulement en se transformant en plasmocytes produisant des auto-anticorps, mais aussi en jouant un rôle crucial dans la régulation immunitaire à médiation cellulaire via la présentation des antigènes, la production de cytokines, la différenciation des lymphocytes T effecteurs et la collaboration avec les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes ⁴⁶. La suppression des cellules B a protégé les rats contre le développement de PH induit par MCT ⁴⁷. Les cellules dendritiques activées ont augmenté l'inflammation périvasculaire et ont ensuite aggravé l'HTP chez la souris ⁴⁸, suggérant son rôle néfaste dans le développement de l'HTP. Des auto-anticorps circulants contre les cellules endothéliales, des antigènes antinucléaires et les fibroblastes ont été rapportés chez 10 à 40 % des patients atteints d'HTAP idiopathique, suggérant un rôle possible de l'auto-immunité dans la pathogenèse des lésions vasculaires pulmonaires ⁴⁹⁻⁵¹. Ces auto-anticorps pourraient jouer un rôle important dans l'apoptose des CE et dans l'expression des molécules d'adhésion cellulaire ⁴⁵. Les cytokines (Th1 et Th17) pourraient provoquer des réponses inflammatoires et auto-immunes dans l'HTAP en produisant de l'interleukine (IL)-6, de l'IL-2, de l'IL-21, de l'interféron- γ et du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) ⁵². Alors que certaines cellules immunitaires favorisent le développement de l'HTAP, comme montré plus haut, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) semblent jouer un rôle protecteur dans de nombreux processus pour atténuer l'HTAP en éliminant diverses cellules immunitaires associées, y compris les cellules tueuses naturelles et les cellules présentatrices d'antigène ⁴⁵. Les cellules Treg sont cruciales pour la régulation de l'inflammation auto-immune ⁵³. Les cellules Treg suppriment l'inflammation vasculaire et atténuent le développement de HTP.

Il a été démontré que le blocage du récepteur du VEGF induit une apoptose significative des CE pulmonaires chez les rats déficients en cellules T, mais pas chez ces rats après une reconstitution immunitaire. Des transferts de cellules Treg avant induction de l'agression endothéliale suggèrent que les Treg fonctionnent en limitant l'agression endothéliale, et pourraient jouer un rôle protecteur vis-à-vis du développement de l'HTAP, en plus de leur action régulatrice éventuelle d'une réponse auto-immune⁵⁰. On note une altération de la voie BMPR-II dans l'HTAP héritable et il a été rapporté que cette voie joue un rôle dans le développement des cellules T dans le thymus⁵⁴, ce qui pourrait contribuer à un défaut intrinsèque de la fonction et/ou du nombre de Treg chez les patients souffrant d'HTAP.

I.3.2. Mutations identifiées chez les patients HTAP

De nombreuses mutations ont été identifiées dans l'HTAP. Depuis plus de 20 ans, des études de liaison génétique ont établi le lien entre le récepteur protéique morphogénétique osseux 2 (*BMPR2*) et le développement de l'HTAP familiale^{55,56}. En 2002, des études ont démontré que, par rapport aux témoins sains, la protéine *BMPR2* était significativement diminuée dans le système vasculaire des patients atteints d'HTAP idiopathique et d'HTAP héritable. Cela était due à la mutation *BMPR2*⁵⁷. Les mutations germinales hétérozygotes du *BMPR2*, un membre de la superfamille du facteur de croissance transformant bêta (*TGF-β*), avec plus de 668 variants pathogènes différents et indépendants sont la cause génétique la plus fréquente d'HTAP^{56,58}. De nombreuses cohortes de patients de tailles et d'ethnies différentes ont unanimement établi que les mutations de *BMPR2* représentent 53 à 86 % des patients ayant des antécédents familiaux d'HTAP et 14 à 35 % des patients atteints d'HTAPi⁵⁹. Contrairement au récepteur *TGF-β*, *BMPR2* nécessite un corécepteur de "type 1" pour former un complexe hétérotétramère et transduire des signaux en réponse à des ligands. Il existe quatre récepteurs de type 1 : activin receptor-like kinase 1 (*ALK1*), *BMPR-1A* (*ALK3*), *BMPR-1B* (*ALK6*) et *ActR-1A* (*ALK2*) et deux récepteurs de type 2 (*BMPR2* (*ActRIIA*) et *ActRIIB*)⁶⁰ (figure 6). La diminution de *BMPR2* peut être due à des mutations de membres de la voie de signalisation en amont ou en aval, tels que *SMAD8*, *ACVRL1*, *BMP9* ou *ALK1* (généralement exprimé sur les cellules endothéliales mais pas sur les cellules musculaires lisses)⁶⁰. La mutation *BMPR2* est liée à des modifications vasculaires pulmonaires dans l'HTAP. Les mutations de *BMPR2* sont associées à une augmentation de l'épaisseur de l'intima vasculaire⁶¹ et ont des conséquences directes sur la sécrétion de cytokines vasodilatatrices et inflammatoires par les cellules endothéliales⁶². Les voies *SMAD* régulées par le *BMP* et le *TGF-β* sont impliquées dans le remodelage vasculaire pulmonaire et la vasoconstriction. Des études décrivent l'existence d'une balance entre ces deux voies qui pourrait réguler la survie, la prolifération ou l'apoptose des cellules vasculaires

pulmonaires ⁶³. Le déficit de *BMPR2* dans les cellules endothéliales favorise la transition dite endothéliale-mésenchymateuse (EndoMT) qui se traduit par une augmentation des niveaux de HMGA1, SNAI1 et Slug, avec une expression accrue de Acta2, SM22 α et de la phospho-vimentine. Cette EndoMT pourrait expliquer l'apparition de lésions occlusives néointimales exprimant à la fois des marqueurs endothéliaux et musculaires lisses ⁶⁴. Le déficit en *BMPR2* dans les CE entraîne une perturbation de la structure du cytosquelette et de l'adhérence, une apoptose accrue, une migration importante, une production importante de cytokines inflammatoires et de vasoconstricteurs et une perte d'identité des cellules endothéliales, qui sont des caractéristiques principales de l'HTAP. Cela peut conduire à la formation de lésions néointimales et de lésions plexiformes complexes dans lesquelles l'on observe également des clusters de cellules endothéliales en prolifération. Les mutations *BMPR2* prédisposent également à un rétrécissement des petites artères pulmonaires en favorisant la prolifération cellulaire et en empêchant l'apoptose. Dans l'HTAP, la prolifération des CML entraîne une hypertrophie médiale due à la dérégulation de la signalisation *BMPR2* liée directement aux modifications de la signalisation extracellulaire et intracellulaire. Ces modifications augmentent la migration, la prolifération et la libération de cytokines des CML de l'artère pulmonaire ^{65,66}. Le déficit de *BMPR2* a été associé à la prolifération et à la différenciation des fibroblastes de l'adventice en myofibroblastes, contribuant ainsi à la production de matrice extracellulaire dans les maladies vasculaires ⁶⁷.

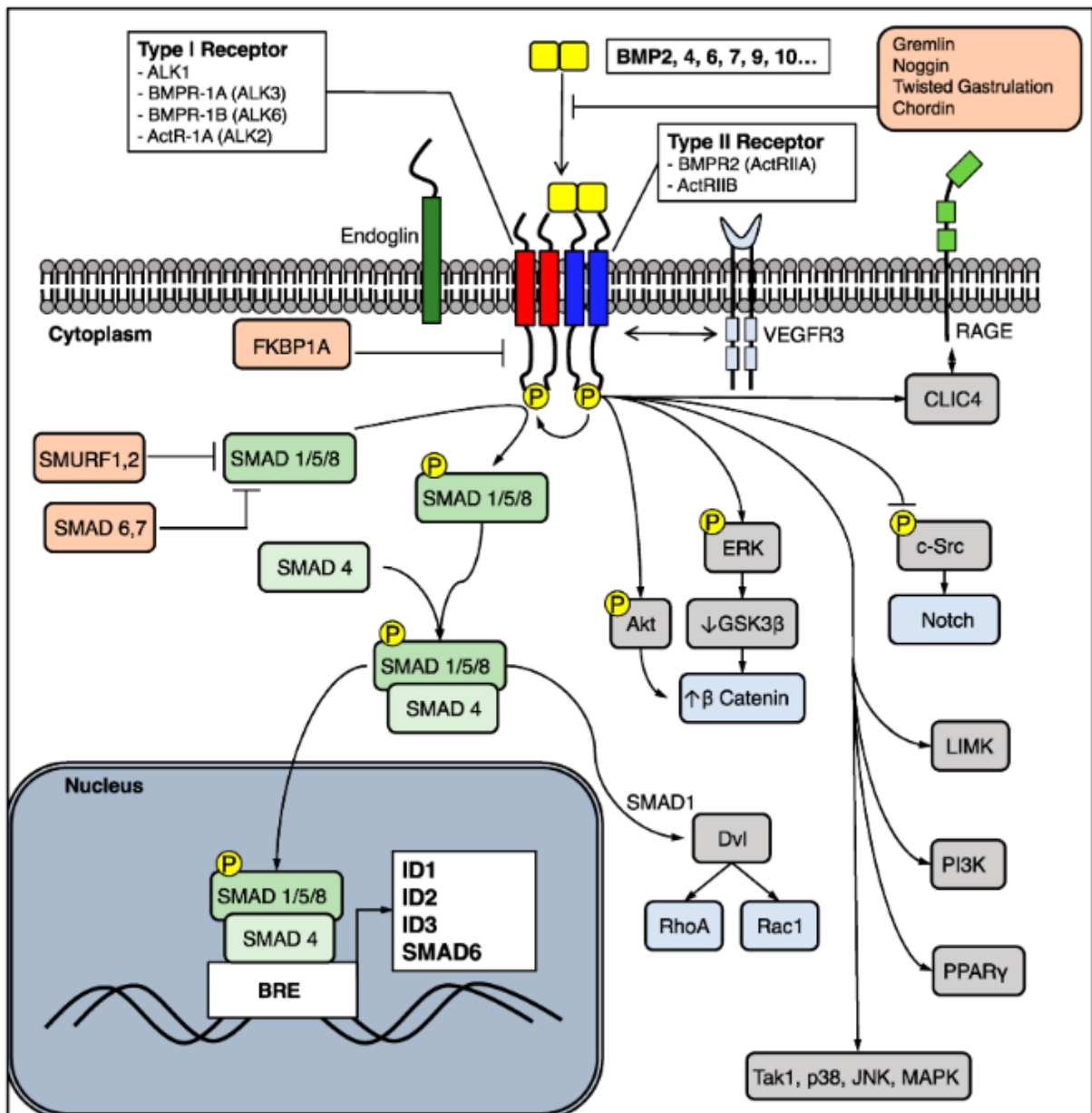


Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation *BMP2* illustrant les cibles potentielles canoniques (vert) et non canoniques (gris, bleu) qui peuvent être activées.

(Andruska et al, 2018) ⁶⁰

Des études de séquençage de l'exome entier de familles atteintes d'HTAP ont également identifié des mutations dans des gènes non liés aux voies de signalisation canoniques des BMP dans 1 à 3 % de tous les cas d'HTAP. Celles-ci incluent des mutations dans *KCNK3*, qui code pour le canal potassique sensible au pH *TASK-1*⁶⁸ et *CAVI*, qui code pour la cavéoline 1 (une protéine membranaire essentielle à la formation de radeaux lipidiques, appelés cavéoles)⁶⁹.

Plusieurs gènes de prédisposition à l'HTAP sont également associés à des anomalies du développement pulmonaire chez l'enfant et l'adulte (figure 7). Des patients atteints de cardiopathie congénitale associée à l'HTAP et certains cas pédiatriques d'HTAP héritable ont été associés à des mutations dans les facteurs de transcription *SOX17* et *TBX4*⁷⁰⁻⁷².

Exprimé sélectivement dans les cellules endothéliales artérielles, *SOX17* est un gène du développement qui est impliqué dans la vasculogénèse et dans le remodelage⁷³. Il joue un rôle fondamental dans l'angiogenèse⁷⁴ et la différenciation artérioveineuse⁷⁵. Sa suppression dans les progéniteurs mésenchymateux conduit à une altération de la formation de micro vaisseaux pulmonaires⁷⁶.

TBX4 est un facteur de transcription de la famille des gènes T-box exprimé dans l'oreillette du cœur, les membres et le mésenchyme du poumon et de la trachée. Ce facteur de transcription est largement exprimé dans l'HTAP chez les patients pédiatriques (touchant une large tranche d'âge de la naissance à la fin de l'âge adulte), avec un âge d'apparition de la maladie de 20 ans plus précoce que les porteurs de la mutation *BMPR2*^{71,77}. La diminution de l'activité de *TBX4* entraîne une diminution de *Fgf10*, un inducteur connu de *Bmp4*. Dans le développement pulmonaire normal, l'expression de *Fgf10* et *BMP4* conduit à l'activation de la voie *BMP*. Les mutations *TBX4* pourraient donc contribuer à l'HTAP par une diminution de l'activation de la voie *BMP*⁷⁸.

Des mutations codant pour l'aquaporine 1 (*AQP1*) et le facteur de différenciation de croissance 2 (*GDF2*) connu sous le nom de *BMP9* ont été identifiées chez des patients HTAP⁷². Récemment, des preuves préliminaires de l'implication du gène *KDR* ont été trouvées dans une vaste étude d'association génétique⁷⁹.

Des mutations bialléliques dans le gène *EIF2AK4*, qui code pour le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 alpha kinase 4, ont été rapportées dans l'hémangiomatose capillaire pulmonaire héritable⁸⁰ et la maladie veino-occlusive pulmonaire, jusqu'à 25 % des cas sporadiques de ces maladies⁸¹.

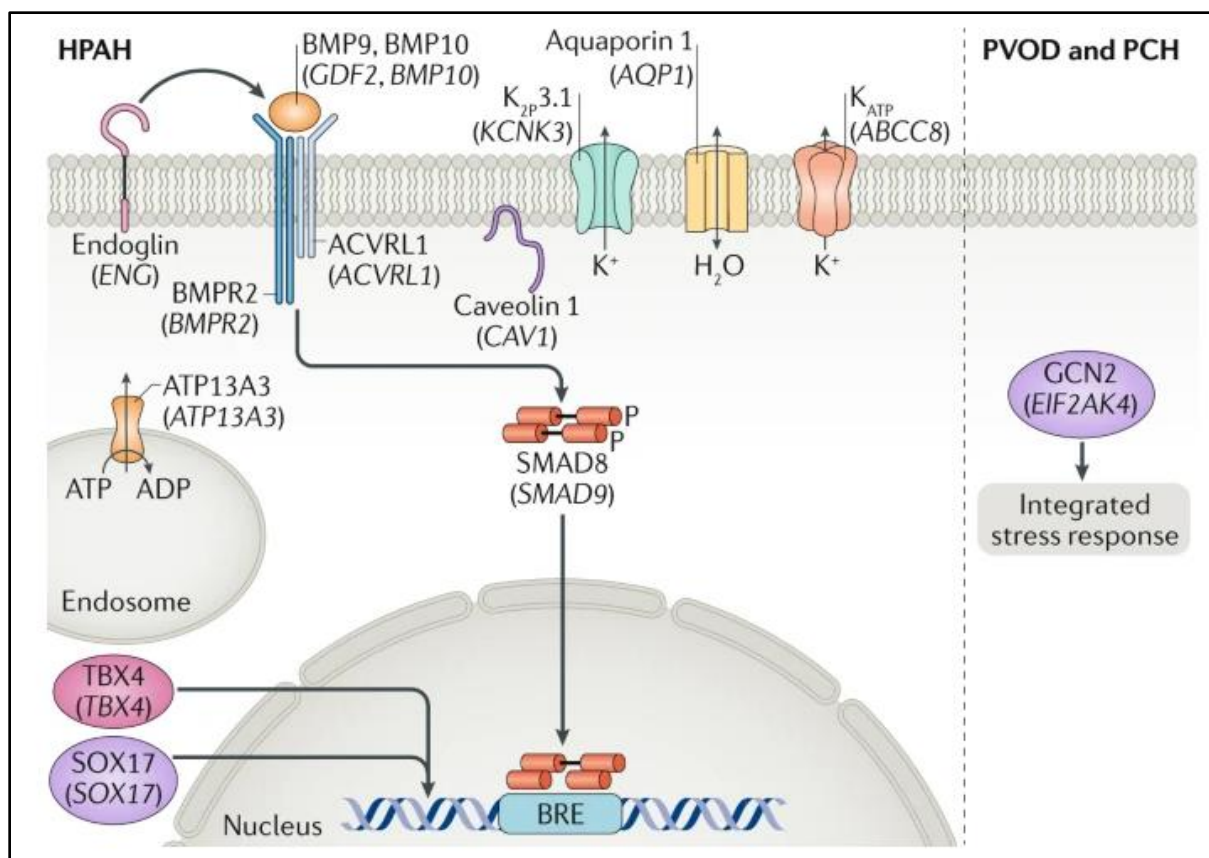


Figure 7 : Principales mutations génétiques dans l’hypertension artérielle pulmonaire (Paul M. Hassoun, 2021) ⁸²

I.3.3. Médiateurs de la prolifération et du remodelage vasculaire

I.3.3.1. Facteurs de croissances

Les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel dans les mécanismes physiopathologiques de l’HTAP comme le contrôle de la prolifération, la migration et la résistance à l’apoptose. Plusieurs d’entre eux sont dérégulés dans l’HTAP.

PDGF

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*PDGF*) est un stimulus mitogène et un inducteur de la migration des CML avec des fonctions autocrines et paracrines ^{83,84}. Le *PDGF-BB* est libéré par les cellules endothéliales et les plaquettes lors d’une lésion vasculaire et peut stimuler la prolifération et la migration des CML-AP. D’autres agents tels que le *TGF-β*, le LPS, le *TNF-α* et l’*IL-1α* influencent le niveau d’expression des isotypes PDGFR individuels ^{85,86} et la synthèse des PDGFR est rapidement augmentée au cours de l’inflammation ⁸⁷. Cinq isoformes de ligands différents du *PDGF* ont été décrits (*PDGF-AA*, *PDGF-BB*, *PDGF-AB*, *PDGF-CC*

et *PDGF-DD*) ainsi que deux récepteurs (*PDGFR- α* et *PDGFR- β*)⁸³. Les deux récepteurs activent les principales voies de transduction de signalisation, notamment *Ras/MAPK*, *PI3K* et la *phospholipase C γ* (activée par des récepteurs d'enzymes à activité tyrosine kinase)⁸⁸. Membre de la famille des récepteurs tyrosine-kinase transmembranaires, les *PDGFR* sont activés après la liaison du ligand (*PDGF*) à leur domaine extracellulaire, provoquant la dimérisation et l'autophosphorylation subséquente des domaines *PDGFR* intracellulaires avec pour conséquence, une augmentation de la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire⁸⁹. La dérégulation de la signalisation *PDGF* ou la surexpression des ligands/récepteurs du *PDGF* a été détectée dans plusieurs tumeurs, telles que le cancer du sein, de la prostate et du foie, le cancer du poumon^{90,91}. Dans l'HTAP, une surexpression de *PDGF-A*, *PDGF-B*, *PDGFR α* et *PDGFR β* a été montrée dans les artères pulmonaires par rapport aux sujets témoins et l'activation de la voie *PDGFR β* dans les lésions vasculaires de l'HTAP est associée à la prolifération cellulaire⁸³. Une autre étude a montré que le taux sérique de *PDGF-BB* des patients atteints d'HTAP était quatre à cinq fois plus élevé, avec un gradient trans pulmonaire significatif par rapport aux sujets témoins⁹². *In vitro* sur les CML-AP, le *PDGF* induit la migration et la prolifération confirmant ainsi le rôle de la signalisation du *PDGF* dans le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP. Cependant, la prolifération et la migration induites par *PDGF-BB* des CML-AP ont été inhibées par l'imatinib⁸³. Dans une autre étude, les auteurs ont montré que le *PDGF* provoque une augmentation de la prolifération cellulaire et la voie métabolique anormale qui constitue l'effet Warburg dans l'état de prolifération des CML-AP et que ce mécanisme impliquait l'activation de la signalisation *PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α* en aval³⁶. Dans les modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire (hypoxie et MCT) on a une augmentation de l'expression du *PDGFR β* dans les poumons des souris et des rats respectivement^{93,94}.

Ainsi, le ciblage de la signalisation du *PDGF* en inhibant les ligands et/ou les récepteurs du *PDGF* a été présenté comme une option thérapeutique innovante. Des études réalisées dans deux modèles sévères de l'HTP avec l'antagoniste du récepteur du *PDGF* STI571 (imatinib) ont montré une inversion du remodelage vasculaire et cardiaque^{83,93}. Après trois mois de traitement par l'imatinib, l'état du patient s'est amélioré de manière impressionnante, avec une amélioration de la capacité d'exercice et une amélioration de l'hémodynamique⁹⁵. Dans une autre étude réalisée sur 202 patients, l'imatinib a amélioré la capacité d'exercice et l'hémodynamique chez les patients atteints d'HTAP avancée. Cependant, les événements indésirables graves tels que des hématomes sous-duraux, de l'anticoagulation et une mortalité élevée due au médicament ont été relevés, ce qui a précipité l'arrêt de l'essai clinique de phase 3⁹⁶. Cette voie reste

néanmoins très importante dans les processus de remodelage vasculaire, vu son implication dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire et nécessite donc la mise en place de nouveaux inhibiteurs. Un essai clinique réalisé avec le séralutinib inhalé, une petite molécule inhibitrice de tyrosine kinase ciblant plus spécifiquement le récepteur du *PDGF*, le récepteur du CSF-1 [*colony-stimulating factor 1*] et c-kit en développement clinique pour l'HTAP a amélioré les paramètres hémodynamiques cardiopulmonaires et réduit la muscularisation des petites artères pulmonaires et l'hypertrophie du ventricule droit dans les modèles Su/Hx et pneumonectomie en augmentant probablement l'expression de BMPR-II ⁹⁷.

VEGF

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*VEGF*) a été isolé en 1989. Le VEGF est une protéine dont le rôle dans l'organisme est de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à travers le processus d'angiogenèse qui est nécessaire pour la mise en place de la croissance des tissus et le développement des organes. Cinq membres de la famille du VEGF sont connus : *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* et *VEGF-E*. Reconnu pour son rôle d'amélioration de la perméabilité vasculaire, de l'angiogenèse et de la survie des cellules vasculaires, le *VEGF-A* est l'isoforme la plus abondante ⁹⁸. Deux récepteurs à activité tyrosine kinase ont été identifiés : *VEGFR* (impliqué dans la migration des cellules endothéliales) et *VEGFR2* (impliqué dans la prolifération des cellules endothéliales).

Le VEGF est très exprimé dans le poumon humain et les taux plasmatiques sont élevés chez les patients atteints d'HTAP sévère ^{92,99}. Le VEGF ainsi que le récepteur du VEGF (*VEGFR*) 2 sont très exprimés par les cellules endothéliales dans les lésions vasculaires complexes (lésions plexiformes) des poumons des patients HTAP ^{100,101}. Dans les modèles expérimentaux de l'hypertension pulmonaire, de nombreuses études ont confirmé que, dans les poumons, l'expression du VEGF et de ses récepteurs était augmentée dans des conditions hypoxiques chroniques ^{100,102} et également dans des échantillons de tissu pulmonaire après une lésion pulmonaire induite par la monocrotaline ¹⁰³. Cependant, l'inhibition du *VEGF* induit le développement de l'HTP *in vivo* en condition d'hypoxie. En effet, le Sugén (SU5416) est un composé qui inhibe la prolifération des cellules endothéliales stimulée par le VEGF via l'inhibition des récepteurs 1 et 2 du VEGF ^{104,105}. Il induit l'apoptose des cellules endothéliales pulmonaires, la perte de petits vaisseaux pulmonaires et l'élargissement de l'espace aérien. Des rats traités avec le SU5416, en association avec une hypoxie chronique, présentaient une hypertension pulmonaire sévère associée à une prolifération des cellules endothéliales ¹⁰⁶. Cette hypertension est freinée lorsque les animaux sont traités avec du VEGF ¹⁰⁷. La voie du *VEGF* reste donc très importante dans la dysfonction des CE qui est à la base du remodelage vasculaire

pulmonaire et la réduction de l'expression des voies impliquées dans la production de vasodilatateurs. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette voie ne sont pas encore très bien élucidés.

TGF- β

Membre de la superfamille des facteurs de croissance transformants, le *TGF* (Transforming Growth Factor), est une cytokine polypeptidique qui est classée en deux groupes. Le *TGF α* , produit par les macrophages, les astrocytes et les kératinocytes, est un facteur de développement cellulaire et le *TGF β* , est un facteur de développement tissulaire qui intervient dans la morphogenèse. Deux voies ont été décrites dans cette famille : la voie du *TGF β* et la voie du *BMPR2*.

Trois isoformes de *TGF β* sont exprimées chez les mammifères adultes (*TGF β* 1-3), dans divers tissus, y compris la paroi artérielle ¹⁰⁸ et sont localisées de manière différentielle dans les principaux vaisseaux sanguins au cours du développement.

Alors que le *TGF β 1* est majoritairement localisé dans l'intima, le *TGF β 2* est limité à la média et le *TGF β 3* est exprimé dans toute la paroi vasculaire ^{109,110}. Cinq récepteurs de la superfamille *TGF β* de type II et sept récepteurs de type I ont été identifiés chez les mammifères ¹¹¹. Les ligands du *TGF β* signalent principalement via l'activin receptor-like kinase 5 (*ALK5*) ¹¹². En plus d'*ALK5*, le *TGF β* peut également intervenir par l'intermédiaire d'un autre récepteur de type I (*ALK1*), via une voie de signalisation distincte médiée par Smad vers *ALK5* ^{113,114}. Alors que *ALK5* est principalement exprimé dans les CML de la media des vaisseaux d'animaux adultes sains, *ALK1* est principalement localisé dans l'endothélium, bien qu'il soit régulé positivement dans les CML suite à une lésion vasculaire aiguë ou pendant l'athérosclérose ^{115,116}.

Les protéines Smad sont les principaux médiateurs intracellulaires de la signalisation de *TGF β* . Les Smad 2 et 3 sont activés par les récepteurs des trois ligands du *TGF β* ¹¹⁷. Les protéines *BMPR-II* agissent comme des ligands, activant le récepteur pour phosphoryler les protéines Smad1, Smad5 et Smad8 qui ont une forte affinité pour le chaperon nucléaire, Smad4. Les complexes résultants se transloquent vers le noyau, se lient lâchement à l'ADN et agissent comme des facteurs de transcription pour les gènes contrôlant ainsi la différenciation, la migration, la prolifération et l'apoptose cellulaires ¹¹⁸. Mécaniquement, *TGF- β* maintient l'homéostasie et bloque la formation de tumeurs en améliorant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose via les voies canoniques des *TGF- β -SMAD*. Lorsque le *TGF β R* sur les cellules tumorales mute, il s'accumule dans la matrice extracellulaire, façonnant un microenvironnement favorable à la tumeur qui favorise la prolifération et l'invasion des cellules

tumorales. Et l'expression du TGF- β est corrélée à l'angiogenèse, à la formation de myofibroblastes et au recrutement de cellules inflammatoires via *PI3K/Akt* non canonique, le *NF- κ B* ou la signalisation *ERK* ¹¹⁹.

Des études ont montré que le *TGF β* est un puissant inducteur du phénotype CML synthétique via une stimulation de la production et la sécrétion de collagène et de protéoglycanes par les CML ^{120,121}. Les réponses des CML au TGF β *in vitro* sont influencées par des facteurs tels que le type de CML (aortique, veineux, etc.), la densité cellulaire et la concentration de TGF β ¹²². En effet, le TGF β peut inhiber ou stimuler la prolifération et la migration des CML aortiques de rat en fonction de la densité d'ensemencement ¹²³. L'inhibition de la prolifération des CML induite par le TGF β , *in vitro* a été associée à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 par la kinase 1 dépendante de la cycline (CDK1) ¹²⁴. Il a été indiqué également que le TGF β inhibe la prolifération des CML induite par le PDGF par une régulation négative de la cycline D1 ¹¹⁵. Malgré certaines données *in vitro* qui mentionnent le fait que le TGF β inhibe la prolifération, la plupart des données *in vivo* indiquent que le TGF β est un puissant stimulateur de la prolifération des CML artérielles par la transactivation de la voie de signalisation *ERK MAPK*. On parle également d'un déséquilibre entre les voies de signalisation TGF β et BMPRII dans l'HTAP. Le déséquilibre est dû, soit à une augmentation du TGF β , soit à une diminution de la signalisation du BMPRII entraînant un phénotype prolifératif en faveur de la progression de l'HTAP ¹²⁵ (figure 8).

En ce qui concerne la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire, des études ont mis en évidence des niveaux significativement plus élevés de TGF- β 1 chez les patients atteints d'HTAP par rapport aux sujets témoins ⁹². *In vivo*, la transduction dysfonctionnelle du signal BMPRII / TGF β entraîne une altération de l'expression des facteurs de transcription, y compris les Smad et une diminution de l'expression de BMPRII dans des modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire de rat hypoxique et MCT. De plus, l'inhibition d'*ALK5* empêche la progression de la maladie chez les rats MCT, suggérant un passage de la signalisation BMPRII/Smad1/5/8 à la signalisation TGF β /Smad2/3 comme mécanisme potentiel de développement de l'HTP ¹²⁶. Pour résumer, cette voie *TGF- β* comprenant *BMPR2*, l'activine receptor-like kinase 1 (*ACVRL1*) et l'endogline (*ENG*) est très importante dans la physiopathologie de l'HTAP. Par conséquent de nombreuses thérapies ciblant cette dernière sont décrites dans l'HTAP.

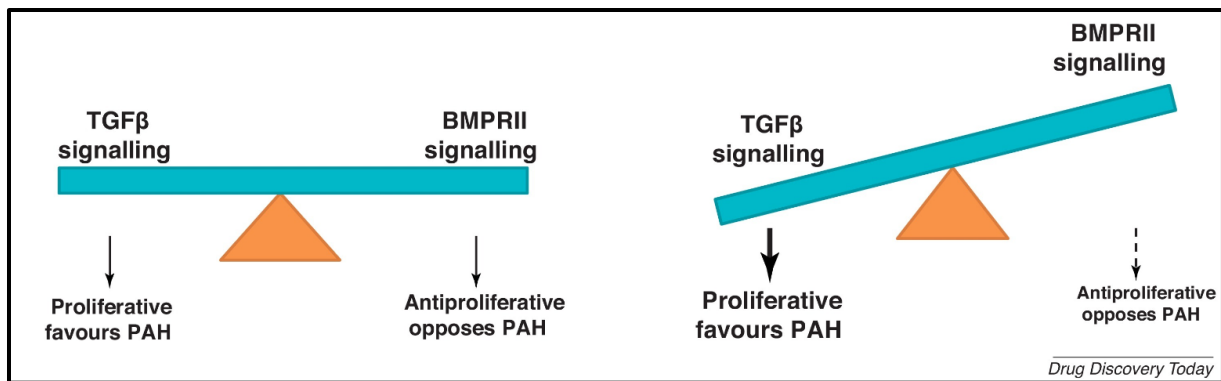


Figure 8 : Équilibre (à gauche) et déséquilibre (à droite) entre les voies de signalisation TGFβ et BMPRII.

(Tielemans et al, 2019) ¹²⁵

I.3.3.2. Sérotonine

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est une monoamine biogénique qui a été isolée du sérum en 1948 et qui possède des propriétés vasoconstrictrices. Elle est synthétisée à partir du tryptophane. Il existe environ 14 récepteurs de la sérotonine appartenant à 7 familles. La plupart d'entre eux sont couplés aux protéines G (5-HT₁, 2, 4, 5, 6, 7) à une exception près, 5-HT₃, qui est un canal ionique multi-sous-unité ¹²⁷. Il a été montré que la sérotonine était associée à l'HTAP induite par des anorexigènes tels que la fenfluramine, l'aminorex et la chlorphentermine qui agissent comme des agonistes sérotoninergiques indirects provoquant la libération de sérotonine des plaquettes et des cellules via le transporteur de la sérotonine (SERT) ¹²⁸. Une étude plus approfondie des artères pulmonaires humaines isolées a confirmé que c'est le récepteur 5-HT₁ qui médie la vasoconstriction induite par la sérotonine ^{128,129}. Les cellules endothéliales pulmonaires produisent des facteurs paracrines régissant la croissance des CML pulmonaires. La sérotonine, le principal facteur de croissance dérivé des CE, est surproduite dans l'hypertension pulmonaire et contribue à l'hyperplasie des CML d'artères pulmonaires ¹³⁰. Les cytokines inflammatoires telles que IL-1β et MCP-1 stimulent l'expression de 5-HTT et donc à la pathogenèse du remodelage vasculaire pulmonaire ¹³¹.

Le récepteur 5-HT₁ est surexprimé chez les patients atteints d'HTAP ¹³² et dans les modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie ¹³³. La signalisation de la kinase Rho initiée par SERT a permis la phosphorylation de ERK par MEK médiée par 5-HT₁B dans la prolifération des CML-AP humaines. Un lien a été décrit entre l'augmentation de l'activité de RhoA et sa liaison avec la 5-HT. En effet, l'inhibition de SERT a empêché la sérotonylation de RhoA induite par 5-HT et l'activation de RhoA/Rho kinase, ainsi que la

prolifération induite par 5-HT des CML-AP, démontrant l'interaction entre la signalisation *ROCK*, *5-HT* et le remodelage vasculaire dans l'HTAP¹³⁴. Une association entre le *SERT* et le *PDGFR* permet la transactivation de ce facteur de croissance dans la prolifération des CML-AP stimulées par la sérotonine chez les patients HTAP¹³⁵. Il pourrait également exister une activation médiée par *5-HTR1B* qui inhiberait la signalisation *BMP* via la Smad 1/5/8¹³⁶. Cibler cette voie via l'inhibition de la sérotonine périphérique et la production locale dans les tissus des malades peuvent arrêter ou inverser le remodelage vasculaire pulmonaire. Le rodatristat éthyl, un pro médicament du rodatristat, un puissant inhibiteur périphérique de tryptophane hydroxylase 1, a démontré son efficacité dans les modèles non cliniques d'hypoxie, de MCT et de SUGEN de l'HTAP et des réductions robustes et dépendantes de la dose de l'acide 5-hydroxyindoleacétique, le principal métabolite de la sérotonine dans le plasma et l'urine de sujets humains sains¹³⁷.

I.3.3.3. Survivine

La survivine ou IAP4 fait partie de la famille de gènes des inhibiteurs de l'apoptose. C'est une petite protéine à activité anti-apoptotique, connue pour être exprimée dans pratiquement tous les cancers, mais pas dans la plupart des types de cellules adultes normales différenciées¹³⁷. Elle est impliquée à la fois dans la prévention de la mort cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire, précisément à la phase G1. La survivine est exprimée dans les artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP, mais pas dans les artères pulmonaires de témoins, et également dans le modèle de rats d'hypertension pulmonaire induite par la MCT, avec expression proportionnelle à la pression artérielle¹³⁸. La survivine régule l'apoptose dépendante des mitochondries et le courant K⁺ dans les CML-AP et son inhibition empêche le remodelage vasculaire dans un modèle de lésion artérielle, et améliore l'hémodynamique pulmonaire et prolonge la survie dans le modèle MCT d'HTP¹³⁹. L'inversion du remodelage vasculaire par le ciblage de la survivine est causée par l'induction de l'apoptose, la suppression de la prolifération et l'activation des canaux Kv dans les CML-AP¹³⁹. La survivine est absente dans les CML au repos mais est induite in vitro par exposition des CML aortiques à 20 % de sérum ou au PDGF, et sélectivement induite dans les segments artériels lésés in vivo¹⁴⁰. Aussi p53 pourrait réprimer la transcription de la survivine par une augmentation de l'expression de p21¹⁴¹. Il a été rapporté que l'expression de la survivine est régulée positivement au niveau transcriptionnel par le facteur nucléaire- κ B (*NF- κ B*), qui, à son tour, peut être activé indirectement par des facteurs de croissance via la voie phosphatidylinositol 3-kinase/Akt¹⁴².

I.3.3.4. NMDAR

Le récepteur du N-méthyl-d-aspartate (*NMDAR*) est composé de quatre sous-unités : deux sous-unités obligatoires du récepteur du glutamate de type NMDA (*GluN1*) et deux sous-unités variables ¹⁴³. Dans les cellules neuronales, par exemple, la sous-unité 2B (*GluN2B*) du récepteur du glutamate de type NMDA régule la mort cellulaire et les mécanismes de survie ¹⁴⁴. Dumas et al ont montré une accumulation de glutamate, une régulation à la hausse du NMDAR et un engagement du NMDAR reflété par une augmentation de la phosphorylation de la sous-unité GluN1 dans les artères pulmonaires de patients humains atteints d'HTAP. Ils ont montré également que la prolifération des CML-AP humaines induite par le PDGF-BB implique l'activation des NMDAR. La déficience en NMDAR des muscles lisses chez la souris a atténué le remodelage vasculaire déclenché par l'hypoxie chronique, soulignant le rôle des NMDAR vasculaires dans l'hypertension pulmonaire. Le blocage pharmacologique des *NMDAR* dans le modèle d'hypertension pulmonaire par la monocrotaline chez le rat a eu des effets bénéfiques sur le remodelage cardiaque et vasculaire, diminuant le dysfonctionnement endothélial, la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose tout en perturbant la voie glutamate-NMDAR dans les artères pulmonaires ¹⁴⁵.

I.3.3.4. NGF

Le facteur de croissance nerveuse (*NGF*) appartient à la famille des neurotrophines. Il est essentiel pour le développement neuronal, la survie et la différenciation ¹⁴⁶. Le *NGF* semble jouer un rôle dans les poumons, contribuant à l'inflammation et au remodelage tissulaire dans plusieurs maladies inflammatoires pulmonaires et participe à l'hyperréactivité bronchique ¹⁴⁷. Il stimule la prolifération et la migration des CML-AP, les CE-AP ainsi que la migration des fibroblastes pulmonaires humains ¹⁴⁸. Des expériences menées *in vitro* et *ex vivo* ont démontré que le *NGF* induit une hyperréactivité aux vasoconstricteurs dans les artères pulmonaires isolées de rat et de l'homme, la prolifération et la migration des CML-AP et des CE-AP. Il induit également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et TNF- α dans des artères pulmonaires isolées de rat et de l'homme ainsi que dans les CML-AP et des CE-AP. Cette sécrétion de cytokines pro-inflammatoires a été bloquée par les inhibiteurs de PIK3 et ERK ¹⁴⁹. La sécrétion de NGF et son expression protéiques sont également augmentées dans les artères pulmonaires de patients atteints d'HTP associée à la BPCO. In vivo, le traitement avec des anticorps bloquants anti-NGF présente des effets à la fois préventifs et curatifs dans le

modèle MCT et l'hypoxie chronique en diminuant de manière significative le remodelage artériel pulmonaire, l'inflammation et la réactivité altérée ¹⁴⁹. Il a aussi été rapporté que l'inflammation et le stress oxydatif induisent la sécrétion de NGF par les cellules artérielles pulmonaires via un mécanisme dépendant du *TGF-β1* qui agit comme un facteur autocrine sur ces cellules ¹⁵⁰.

I.3.4. Altération du tonus vasculaire pulmonaire

L'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires est une des caractéristiques de l'HTAP, et résulte d'une augmentation des vasoconstricteurs (thromboxane, endothéline-1) et d'une réduction des vasodilatateurs (prostacycline, oxyde nitrique).

I.3.4.1. Implication des facteurs vasoconstricteurs (Endothéline-1 et Thromboxane A2)

La CML vasculaire est le composant cellulaire principal de la média. La migration et la prolifération des CML conduisent à la formation de la néo-intima qui est à la base du remodelage vasculaire pulmonaire. La vasoconstriction est un mécanisme physiologique qui est reflété par la réduction du diamètre des vaisseaux sanguins. Elle intervient normalement en réponse à la lésion d'un vaisseau pour limiter le saignement. C'est la première étape de l'hémostase. La vasoconstriction est régulée par deux médiateurs que sont l'endothéline-1 (ET-1) et le thromboxane A2 (TXA2) via l'activation directe de récepteurs couplés aux protéines G sur les (CMLV).

I.3.4.1.1. Endothéline-1

- Les endothélines comprennent trois peptides de 21 acides aminés structurellement similaires (*ET-1*, *ET2* et *ET3*). *ET-1* et *ET-2* activent deux récepteurs couplés aux protéines G, *ETA* et *ETB*, avec une affinité égale, tandis que *ET-3* a une affinité plus faible pour le sous-type *ETA*. *ET-1* est l'isoforme la plus abondante dans le système cardiovasculaire humain et elle est produite principalement par les cellules endothéliales vasculaires. *ET-1* interagit principalement avec les récepteurs *ETA* sur le muscle lisse sous-jacent ¹⁵¹. L'expression pulmonaire d'*ET-1* est élevée chez les patients atteints d'HTAP ¹⁵² ainsi que dans divers modèles animaux expérimentaux ¹⁵³. De nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans la production de l'*ET-1*. Il s'agit de *AP-1*, *NF-κB*, *FOXO1*, *VezF1*, *HIF-1* et *GATA2* ¹⁵¹. L'*ET-1* stimule la prolifération des CMLV, la migration ^{154,155}, la contraction ¹⁵⁶, le remodelage matriciel, la synthèse de matrice extracellulaire via l'expression de facteurs de croissance pro-

prolifératifs tels que le PDGF et le TGF- β ^{157,158}. L'un des régulateurs les plus importants de la production d'ET-1 dans les cellules endothéliales est le TGF- β . Il a été démontré dans des cellules endothéliales aortiques bovines en culture que la signalisation TGF- β via la voie ALK5/Smad3 entraîne une augmentation de pré-proendothéline (préproET-1)¹⁵⁹. Dans les vaisseaux systémiques et pulmonaires, les récepteurs ETA sont exprimés principalement par les CMLV^{160,161} tandis que les récepteurs ETB sont exprimés par les cellules endothéliales¹⁶² et CMLV¹⁶³. Les deux récepteurs ETA et ETB exprimés par les CMLV interviennent dans la vasoconstriction et la prolifération cellulaire tandis que les récepteurs ETB endothéliaux activent la libération de facteurs vasodilatateurs et antiprolifératifs dérivés de l'endothélium, tels que la prostacycline ou l'oxyde nitrique. Toutes ces données sur le rôle de l'ET-1 dans les différents processus clés de l'HTAP ont permis le développement de plusieurs antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1. Ces antagonistes permettent aujourd'hui une prise en charge des patients avant la transplantation pulmonaire.

I.3.4.1.1. Thromboxane A2

Le thromboxane A2 (TXA2) appartient à la famille des prostanoides qui sont synthétisés par les cyclooxygénases (COX) à partir de l'acide arachidonique. Il est généralement produit par les thrombocytes (plaquettes sanguines) qui engendre une augmentation de la pression artérielle. Le TXA2 est très instable avec une demi-vie très courte de 30 secondes. Il active l'agrégation des plaquettes et participe à la coagulation sanguine et à la formation du thrombus ou caillot sanguin. Le TXA2 est un puissant médiateur de la vasoconstriction. Il agit aussi comme un puissant médiateur pro-inflammatoire favorisant l'inflammation, la fibrose, le remodelage des vaisseaux sanguins suite à une lésion endothéliale^{164,165}. Il exerce ses effets constricteurs en liant les récepteurs TP sur les CMLV, entraînant l'inhibition des canaux K⁺ voltage-dépendants, la dépolarisation membranaire, l'activation des canaux Ca²⁺ de type L, et finalement la contraction des CML¹⁶⁶. Des déséquilibres des niveaux de TXA2 ont été impliqués dans une série de maladies cardiovasculaires, rénales et pulmonaires, y compris l'HTAP^{164,165}. Un métabolite stable du TXA2 (11-déhydro-thromboxane B2) dosé dans l'excrétion urinaire est augmenté chez les patients souffrant d'hypertension pulmonaire primaire et secondaire par rapport aux témoins suggérant que l'élévation soutenue de la pression artérielle pulmonaire est due à l'activation persistante des plaquettes¹⁶⁷. Chez les nourrissons atteints d'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né, des taux élevés de TXB2 (un métabolite inactif issu de la dégradation du TXA2) sont positivement corrélés à une augmentation significative des pressions artérielles pulmonaires¹⁶⁸. Suite à ces observations

qui identifient le TXA2 comme un puissant vasoconstricteur, inducteur de l'agrégation plaquettaire et mitogène des muscles lisses, son indication en tant que cible thérapeutique potentielle pour l'HTAP a été évoquée. Des antagonistes des récepteurs TP du TXA2, tels que NTP42 ont été développés et considérés comme des médicaments thérapeutiques prometteurs pour l'HTAP, non seulement en inhibant la vasoconstriction excessive, mais également en prévenant la thrombose des micro-vaisseaux et, potentiellement, en limitant le remodelage de l'artère pulmonaire, ainsi que l'inflammation et la fibrose trouvées dans l'HTAP¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Des études expérimentales *in vivo* chez le rat ont montré que le traitement par NTP42 (un antagoniste du récepteur du thromboxane) atténue le remodelage vasculaire pulmonaire et réduit la gravité de l'HTP induite par la MCT à travers une réduction de la PAPm et de la RVSP mais sans effet sur l'indice de Fulton. Le NTP42 a également atténué à la fois la densité des mastocytes et la fibrose pulmonaire induite par la MCT¹⁷¹. Dans le modèle Sugén/Hypoxia (SuHx), le NTP42 atténue les paramètres de l'HTP, en combinaison avec le Sildénafil¹⁷⁰. Dans le modèle MCT d'HTP, le NTP42:KVA4 pourrait atténuer l'HTAP non seulement en soulageant les manifestations pulmonaires, mais également en réduisant le remodelage du ventricule droit¹⁶⁹. Le NTP42:KVA4, récemment développé comme médicament administré oralement a été évalué dans le cadre d'un essai clinique de phase I (NCT04919863) chez 79 volontaires sains de sexe masculin où il a été confirmé comme sûr, bien toléré, avec de bons profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques après administration orale unique et répétée¹⁷².

I.3.4.2. Implication des facteurs vasodilatateurs (monoxyde d'azote et prostacycline)

Les vasodilatateurs ont pour rôle de dilater les vaisseaux sanguins se traduisant par une augmentation de la lumière de ces derniers. Ils ont un effet contraire aux vasoconstricteurs et la conséquence principale de leur action est la diminution de la pression artérielle. De nombreuses molécules capables d'induire la vasodilatation ont été décrites dans la littérature et leurs efficacités varient d'une substance à une autre. Deux vasodilatateurs (prostacycline, oxyde nitrique) ont été associés au développement de l'HTAP.

I.3.4.2.1. La prostacycline

La prostacycline ou prostaglandine (PGI₂) connue pour son activité vasodilatatrice est une substance endogène synthétisée par les CE vasculaires,¹⁷³ à partir de la prostaglandine H₂ d'origine plaquettaire, avec une action d'inhibition de l'activité plaquettaire et des effets

antiprolifératifs ¹⁷⁴. Comme le TXA₂, la prostacycline est dérivée de l'acide arachidonique. Cependant, elle a des propriétés physiologiques différentes du TXA₂ telles que son action vasodilatatrice et antiagrégante plaquettaire. La demi-vie de la prostacycline est brève en raison de son hydrolyse rapide. Une diminution de la prostacycline chez les patients souffrant d'hypertension pulmonaire primaire ou secondaire implique une altération de la fonction des CE dans l'hypertension pulmonaire ¹⁶⁷. Une amélioration du débit cardiaque, de la résistance vasculaire pulmonaire et de la tolérance à l'effort pendant huit semaines de traitement avec une perfusion intraveineuse continue de prostacycline (époprosténol sodique) a été rapportée ¹⁶⁷. De nombreuses dérivées ou analogues de la prostacycline sont utilisées comme traitement dans l'HTAP. Voir I.5.3

I.3.4.2.2. Le monoxyde d'azote (NO)

Initialement baptisé, Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) en 1980 par Furchgott et Zawadzki ¹⁷⁵, cette appellation va changer et devenir NO pour monoxyde d'azote. Le NO est un radical libre gazeux qui joue le rôle de médiateur pour de nombreuses substances relaxantes du muscle lisse vasculaire telle que la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'acétylcholine et l'adénosine triphosphate (ATP). Le NO provoque également une inhibition de l'agrégation plaquettaire par des mécanismes impliquant le cGMP (cyclic guanosine monophosphate) ^{176,177}. Le NO est donc un puissant vasodilatateur qui est synthétisé par divers tissus et cellules de mammifères tels que l'endothélium vasculaire, les macrophages, les neutrophiles, les cellules hépatiques de Kupffer, le tissu surrénalien, le cervelet et d'autres tissus. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine endogène par la NOS endothéliales (eNOS) qui est l'isoforme majoritairement présente dans les CE et régulant la fonction vasculaire ¹⁷⁷. L'altération de la voie du NO dans l'endothélium pulmonaire entraîne une augmentation du tonus des muscles lisses vasculaires et un remodelage vasculaire, et contribue ainsi au développement et à la progression de l'HTAP ¹⁷⁸. A faible dose, le NO stimule la guanylate cyclase soluble (GCs) pour induire la formation de cGMP et la relaxation des CML en réduisant les concentrations intracellulaires en calcium et en déphosphorylant les chaînes légères de la myosine. L'hypertension pulmonaire est associée à une diminution de l'expression de la eNOS avec pour conséquence une contribution à la vasoconstriction pulmonaire et à l'aggravation de la maladie ¹⁷⁹. Cependant, l'expression de la eNOS est augmentée dans les lésions plexiformes de l'hypertension pulmonaire ¹⁸⁰ et est deux fois plus élevée chez les patients d'HTAPi ¹⁸¹. Dans les modèles d'HTP, une étude montre que l'exposition chronique à l'hypoxie augmente l'expression d'eNOS ¹⁸² alors qu'une autre montre l'inverse avec une diminution de la

production de eNOS¹⁸³. Les différentes études menées sur la dérégulation et la compréhension de cette voie ont donné des résultats très variables voire contradictoires, laissant planer des incertitudes sur son rôle exacte dans l'HTAP. Néanmoins, des traitements ont été mis en place et ces derniers visent la stimulation, au niveau pulmonaire, de la signalisation du NO par la suppression de la dégradation de cette voie via des inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 (PDE-5) ou par l'augmentation de la formation de la cGMP endothéliale, qui régule en aval les effets de la voie. Ainsi, l'inhalation prolongée et à faible concentration du NO prévient le développement de l'hypertension pulmonaire *in vivo* en induisant une vasodilatation pulmonaire soutenue et une réduction du remodelage vasculaire pulmonaire^{184,185}. Chez l'homme, les traitements ciblant cette voie sont des activateurs de la GCs (le riociguat) et des inhibiteurs de la PDE-5 (le sildénafil et le tadalafil).

I.3.5. Inflammation

La signature pathologique caractéristique de l'HTAP est le remodelage vasculaire pulmonaire impliquant toutes les couches de la paroi vasculaire, telles que l'intima (les cellules endothéliales), la média (les cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire) et l'adventice (les fibroblastes)¹⁸⁶. Pour combattre ou éliminer des agents pathogènes ou des corps étrangers responsables d'une infection, d'une réaction allergique ou d'une réponse immunitaire, l'organisme réagit à travers une série de réactions inflammatoires, qui peuvent dans certains cas devenir chroniques et pathologiques. L'inflammation chronique est un mécanisme important de l'HTAP humaine et dans les modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire. L'inflammation périvasculaire pulmonaire joue un rôle important dans les premiers stades de du remodelage vasculaire pulmonaire conduisant à l'HTAP. Une infiltration accrue de lymphocytes T, de lymphocytes B, de macrophages, de mastocytes et de cellules dendritiques, a été retrouvée dans les lésions vasculaires pulmonaires de patients atteints d'HTAP sévère^{187,188}. Les niveaux circulants de certaines cytokines et chimiokines sont anormalement élevés chez les patients HTAP, contribuant à une contractilité exagérée et à la prolifération des cellules vasculaires. Ce sont des facteurs de régulation importants de l'HTAP et sont également des marqueurs cruciaux pour le diagnostic et le traitement de cette pathologie. En effet, les cellules vasculaires pulmonaires vont libérer des médiateurs de l'inflammation (chimiokines et cytokines) qui, à leur tour, vont recruter des cellules inflammatoires telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les lymphocytes B, les lymphocytes T et les lymphocytes T régulateurs. Les taux circulants de médiateurs de l'inflammation tels que les interleukines (IL1 beta et IL6)^{189,190}, les facteurs de nécrose tumorale tels que le TNF alpha,

les chimiokines CXC3L1, CCL2, et CCL5 sont élevés dans les HTAPi^{187,191}. L'expression de la protéine groupe de haute mobilité box-1 (HMGB1) et du récepteur de type toll 4 (TLR4) est significativement augmentée dans les poumons des patients atteints d'HTAP, et HMGB1 favorise l'HTAP par l'activation de TLR4^{192,193}. Par le recrutement de ces différents types cellulaires, l'inflammation va contribuer au remodelage vasculaire dans l'HTAP via le remodelage de la matrice, la prolifération, le dépôt de collagène et la migration (figure 9). Les niveaux d'expression des molécules d'adhésion pro-inflammatoires telles que ICAM1, VCAM1 et la sélectine E sont nettement élevés dans l'endothélium vasculaire pulmonaire et dans les cellules endothéliales des patients HTAP²⁵. Chez les souris HTP induites par l'hypoxie, l'IL-33, membre de la famille des cytokines IL-1, se lie aux récepteurs membranaires ST2 et initie le remodelage vasculaire pulmonaire en régulant à la hausse l'expression du facteur 1 α inducible par l'hypoxie (HIF-1 α) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)¹⁹⁴.

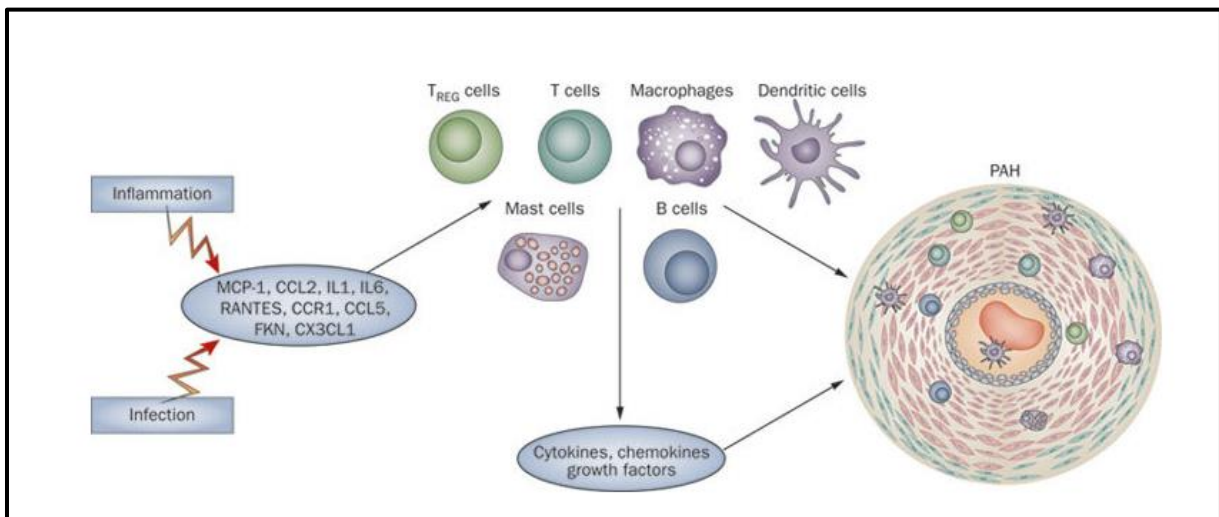


Figure 9 : Remodelage vasculaire médié par l'inflammation dans l'HTAP.

(Schermully et al 2011)¹⁹⁵

I.4. Diagnostic de l'HTAP

L'hypertension artérielle pulmonaire est une pathologie rare, complexe et incurable avec une absence de signes cliniques ou symptômes claires identifiés. Il est donc important de connaître l'étiologie avant d'opter pour une thérapie adaptée. Le symptôme principal évocateur de l'HTAP est l'essoufflement à l'effort (dyspnée). La non connaissance ou l'absence de lien directe entre la dyspnée et l'HTAP entraîne souvent un retard dans le diagnostic d'environ 2 ans entre l'apparition des symptômes et la prise en charge des patients¹⁹⁶. Plusieurs examens complémentaires sont nécessaires pour identifier la cause de l'essoufflement :

- **Une radiographie pulmonaire** permet de rechercher des signes évocateurs d'HTAP ou une quelconque maladie pulmonaire.

- **Le test de marche de 6 minutes (TM6)** permet d'effectuer plusieurs mesures qui sont : la distance parcourue, la saturation en oxygène (% d'oxygène transporté dans les globules rouges), le rythme cardiaque, la tension artérielle et l'évaluation de l'essoufflement. L'objectif de ce test de marche est d'évaluer la capacité à l'effort du patient afin d'apprécier la sévérité de l'HTAP.
- **La Scintigraphie pulmonaire** est un examen permettant d'évaluer la répartition de la circulation sanguine et la circulation de l'air dans les poumons à la recherche de l'existence de caillots sanguins dans les artères pulmonaires.
- **Un Angioscanner** est réalisé dans le but de rechercher la présence de maladies respiratoires (anomalies et malformations pulmonaires) et de visualiser les vaisseaux pulmonaires.
- **L'épreuve fonctionnelle respiratoire (EFR) et gaz du sang** avec un prélèvement de sang artériel pour apprécier l'oxygénation du sang va permettre de mesurer la capacité respiratoire et de rechercher une hypoxie (taux d'oxygène bas dans le sang).
- **Une échographie cardiaque transthoracique couplée au Doppler** va permettre d'évaluer la PAPm et la dilatation des cavités du ventricule droit.
- **Le Cathétérisme cardiaque droit** est l'examen indispensable qui permet de confirmer le diagnostic d'HTAP et surtout d'apprécier la sévérité de la maladie. Il permet de choisir le traitement le mieux adapté pour le patient en tenant compte de tous les examens qui ont été effectués plus haut. Au cours de cet examen, la PAPm est mesurée et elle est supérieure à 20 mmHg dans le cas d'une HTAP.

D'autres paramètres sont mesurés et les valeurs sont indiquées dans le tableau 3.

Définition	Paramètres hémodynamiques	Groupes d'htap
Hypertension pulmonaire précapillaire	PAPm > 20 mmHg PAPO ≤ 15 mmHg RVP > 2 UW	Groupes 1, 3, 4 et 5
HTP postcapillaire isolée	PAPm > 20 mmHg PAPO > 15 mmHg RVP ≤ 2 UW	Groupes 2 et 5
HTP pré et postcapillaire combinée	PAPm > 20 mmHg PAPO > 15 mmHg RVP > 2 UW	Groupes 2 et 5

Tableau 3 : Principales valeurs hémodynamiques du cathétérisme cardiaque droit pour le diagnostic de à l'HTAP

I.5. Traitements de l'HTAP

Dans l'HTAP, on note un déséquilibre de la voie du NO, de la prostacycline et de l'endothéline au cœur du développement et de la propagation de la maladie vasculaire chez les patients. Les traitements spécifiques de l'HTAP, ciblent essentiellement les trois grandes voies de la physiopathologie de cette maladie. Il s'agit de la voie de l'endothéline avec les antagonistes des récepteurs de l'endothéline, la voie du NO avec les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 et l'activateur de la guanylate cyclase soluble et la voie des prostacyclines avec les analogues des prostacyclines et les agonistes des récepteurs aux prostacyclines ⁸² (Figure 10).

Des progrès considérables ont été réalisés dans le développement de nouvelles thérapies pour le traitement de l'HTAP. Les traitements actuels sont essentiellement vasodilatateurs et non curatifs, cependant, ils atténuent les symptômes de la maladie et permettent d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients. A ce jour, aucun médicament pouvant cibler de façon spécifique le remodelage vasculaire n'est disponible sur le marché. Et en plus de cela, le rôle du microbiote n'est pas pris en charge dans les traitements de l'HTAP.

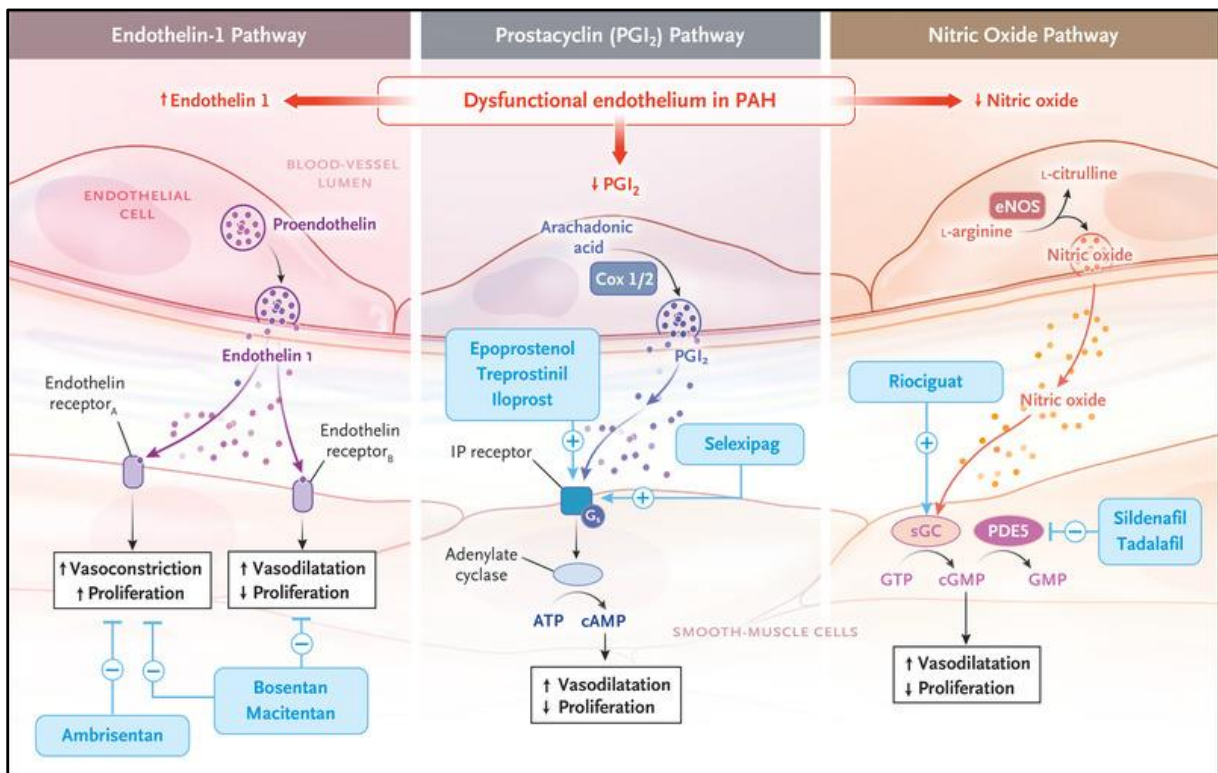


Figure 10 : Trois voies classiques de thérapie ciblée dans la physiopathologie de l'HTAP (Hassoum, PM., 2021) ⁸²

I.5.1. Voie de l'Endothéline : antagonistes des récepteurs à l'endothéline (ERA)

L'endothéline-1 (ET-1) a été découverte en 1988 à partir du surnageant de culture de cellules endothéliales aortiques bovines par Masashi Yanagisawa, un biologiste et médecin japonais ¹⁹⁷. L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur aux propriétés mitogènes ou co-mitogènes qui agit par la stimulation de 2 sous-types de récepteurs que sont les récepteurs de l'endothéline sous-type A (ETA) et les récepteurs de l'endothéline sous-type B (ETB).

Le Bosentan (Tracleer®) est le premier antagoniste dual des récepteurs ETA/ETB (qui inhibe la liaison de l'ET-1 au récepteur ETA et ET-B) ¹⁹⁸, par voie orale, approuvé par la Food and Drug Administration pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) ¹⁹⁹.

L'Ambrisentan a été développé en tant qu'antagoniste des récepteurs ETA avec une puissance élevée, une biodisponibilité orale élevée et une longue demi-vie adaptée à une administration une fois par jour ²⁰⁰. Il a été approuvé par la FDA en 2007 pour le traitement des HTAP. Le métabolisme de l'ambrisentan est indépendant des voies du cytochrome P450 et se produit principalement par glucuronidation et transport via la bile dans les fèces. L'Ambrisentan a été évalué pour le traitement de l'HTAP, dans une étude de dose randomisée en double aveugle avec des résultats prometteurs et est aujourd'hui l'un des traitements de première ligne de l'HTAP²⁰¹.

Le Sitaxsentan (Thelin™) est un puissant antagoniste des récepteurs ETA dérivé des amidothiophènesulfonamides avec une bonne biodisponibilité orale et une longue durée d'action ²⁰². Un premier essai contrôlé randomisé avait montré que le Sitaxsentan améliore la capacité d'exercice et la classe fonctionnelle chez les patients atteints d'HTAP ²⁰³. Cependant, il a été retiré de la production par les fabricants en 2010 en raison d'une toxicité hépatique sévère idiosyncrasique ²⁰⁴.

Le plus récent ERA, le macitentan (antagoniste ETA et ETB) a été approuvé par la FDA en 2013 pour des indications similaires. Il s'agit d'une modification de la structure du bosentan pour améliorer son efficacité, son innocuité et sa biodisponibilité. Dénommé « essai SERAPHIN », cette étude a démontré que cette molécule permet une réduction de la mortalité et la morbidité chez les patients HTAP ²⁰⁵. Actuellement, seuls le bosentan, l'ambrisentan et le macitentan sont utilisés en clinique.

Il a été rapporté que les ARE provoquent une toxicité hépatique dose-dépendante. Cet effet de classe semble être lié à une altération du transport des sels biliaires, provoquant une accumulation de sels biliaires toxiques dans les hépatocytes ²⁰⁶. En raison de l'hépatotoxicité des ERA, la Food and Drug Administration exige une surveillance des tests de la fonction

hépatique au début du traitement et à intervalles mensuels. Les patients présentant une augmentation des enzymes hépatiques au départ ne doivent pas recevoir d'ARE ¹⁹⁹.

I.5.2. Voie de l'oxyde nitrique (NO)

Deux caractéristiques pathologiques importantes de l'HTAP sont une diminution de la production d'oxyde nitrique endothélial ainsi qu'une expression et une activité accrues de la phosphodiesterase de type 5 (PDE5) dans les cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire et le myocarde ventriculaire droit. En effet, dans les poumons des sujets témoins, l'oxyde nitrique synthase est exprimée à un niveau élevé dans l'endothélium vasculaire de tous les types de vaisseaux. Cependant, on note une absence ou une réduction de l'expression de l'enzyme dans l'endothélium vasculaire des artères pulmonaires présentant des anomalies de types lésions plexiformes chez les patients souffrant d'hypertension pulmonaire ¹⁷⁹. La diminution de l'expression du NO et l'augmentation de l'activité de la PDE5 vont entraîner une diminution des niveaux de guanosine monophosphate cyclique, qui à son tour augmente le calcium intracellulaire et le potassium, favorisant la vasoconstriction, la prolifération des CML et la résistance à l'apoptose ²⁰⁷. Inhiber la PDE5 et favoriser le maintien du NO pourraient donc être bénéfiques pour traiter l'HTAP. C'est alors que les inhibiteurs de la PDE5 vont faire leur apparition dans les traitements de l'HTAP.

I.5.2.1. Inhibiteurs des phosphodiesterase (PDE5)

Le sildénafil et le tadalafil sont deux inhibiteurs de la PDE5 qui ont démontré une efficacité clinique dans l'HTAP. Le sildénafil (Revatio), un inhibiteur de la PDE5 à courte durée d'action ²⁰⁸ a été approuvé pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire par la FDA et par l'Agence européenne des médicaments (EMA) en 2005 à la suite de l'essai SUPER ²⁰⁹. C'est un traitement par voie orale trois fois par jour pendant 12 semaines. Le sildénafil améliore la capacité d'exercice et l'hémodynamique chez les patients présentant une HTAP symptomatique se traduisant par une diminution de la pression artérielle pulmonaire, de la résistance vasculaire pulmonaire et une amélioration de l'index cardiaque. Les céphalées, rougeurs, dyspepsie, congestion nasale, sensations vertigineuses, nausées, bouffées de chaleur, perturbation visuelle, cyanopsie et vision trouble ont été identifiées comme des effets secondaires liés à la prise du sildénafil mais sans lien démontré avec la dose ^{209,210}. Le tadalafil, le second inhibiteur de la PDE5 a été évalué pour le traitement de l'HTAP au cours de l'essai PHIRST. Il a une action prolongée et avait précédemment été approuvé pour la dysfonction érectile en 2003 ²⁰⁸. Le tadalafil présente une demi-vie plasmatique supérieure au sildénafil et il a amélioré la capacité

d'exercice sur un test clé qui est la distance en six minutes de marche et l'hémodynamique après 16 semaines, mais moins que le groupe bosentan, par exemple. Il a été bien toléré avec des effets indésirables (légers à modérés) qui n'étaient pas dépendants de la dose comme avec le sildénafil. Et enfin, contrairement au sildénafil, les patients reçoivent une seule dose de 40 mg par jour de tadalafil ²¹⁰. Après avoir montré leur efficacité en monothérapie, le sildénafil et le tadalafil ont été combinés au bosentan et à l'époprosténol et cette combinaison améliore la capacité à l'effort, la qualité de vie des patients et retarde la dégradation de l'état clinique du patient ²¹¹.

I.5.2.2. Activateurs de la guanylate cyclase soluble (GC)

Le NO provoque une vasodilatation en stimulant sa cible moléculaire, la guanylate cyclase soluble. Lorsqu'elle est liée au NO, elle génère de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) ²¹². Le riociguat est un activateur de la guanylate cyclase soluble (GC) et agit indépendamment du NO pour favoriser un remodelage vasculaire et une vasodilatation pulmonaire. Au cours de l'essai PATENT-1, le rôle du riociguat a été évalué dans l'HTAP. Il a amélioré la résistance vasculaire pulmonaire, les paramètres hémodynamiques et le délai d'aggravation clinique ²¹³.

I.5.3. Voie de la prostacycline

La prostacycline est une substance endogène qui est produite par les cellules endothéliales vasculaires et induit une vasodilatation, une inhibition de l'activité plaquettaire et des effets antiprolifératifs ¹⁷⁴. On observe une dérégulation des voies métaboliques de la prostacycline chez les patients atteints d'HTAP avec une réduction de l'expression de la prostacycline synthase dans les poumons des patients ^{174,214}. Les analogues de la prostacycline sont de puissants vasodilatateurs pulmonaires qui possèdent également des propriétés antiprolifératives et antithrombotiques. Ces analogues vont induire une relaxation des artères pulmonaires par l'activation de la production d'AMPc.

L'époprosténol a été le premier traitement ciblant l'HTAP démontré dans un essai contrôlé randomisé pour améliorer la survie dans l'HTAP ²¹⁵. En effet, une amélioration symptomatique et hémodynamique, ainsi qu'une amélioration de la survie chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire sévère ont été observées après une perfusion intraveineuse continue d'époprosténol. Cependant, l'époprosténol a une courte demi-vie dans la circulation et nécessite une administration continue et de façon permanente par voie intraveineuse au moyen de pompes

à perfusion et de cathéters. Une instabilité à température ambiante et plusieurs effets indésirables (diarrhées, migraines et vomissements) pouvant entraîner des complications graves lui sont associés ¹⁷⁴. Pour contourner ces problèmes liés à l'époprosténol, d'autres médicaments ont été développés.

Le tréprostinil est un dérivé de la prostacycline utilisable par administration intraveineuse, sous-cutanée et par inhalation, qui a été approuvé par la FDA pour le traitement de l'HTAP en 2002 ²¹⁶. Contrairement à l'époprosténol, le tréprostinil est chimiquement stable, à température ambiante et à pH neutre, et sa demi-vie plasmatique est plus longue. En plus de favoriser la relaxation des muscles lisses dans le système vasculaire pulmonaire, le tréprostinil a des effets supprimeurs sur l'agrégation plaquettaire, la prolifération des cellules musculaires lisses et l'inflammation ²¹⁷. Les événements indésirables et les effets secondaires étaient dans la plupart des cas liés au site de perfusion (douleur, réaction et saignement) et à l'utilisation des prostacyclines telles que les maux de tête, les nausées, les douleurs à la mâchoire, la vasodilatation ²¹⁶.

L'iloprost, un analogue de la prostacycline, est un traitement efficace pour les patients souffrant d'hypertension pulmonaire sévère. Pour le traitement à long terme, des inhalations répétitives d'iloprost sont administrées 6 à 9 fois par jour à cause de sa demi-vie très courte et chaque inhalation nécessite 10 à 15 min ²¹⁸. Ses effets secondaires sont similaires à ceux observés lors d'une perfusion d'époprosténol. C'est un puissant vasodilatateur doté de propriétés antiprolifératives et antithrombotiques considérables avec une amélioration nette des paramètres hémodynamiques des patients ²¹⁹.

Le sélexipag a été découvert et synthétisé à l'origine par Nippon Shinyaku ²²⁰. Le traitement par le sélexipag a entraîné une amélioration de la fonction endothéliale vasculaire, une réduction de l'hypertrophie de la paroi artérielle pulmonaire, une diminution de la pression systolique ventriculaire droite et une amélioration de la survie dans le modèle monocrotaline d'hypertension pulmonaire ²²¹. Avec une demi-vie plus longue, c'est un agoniste sélectif oral (2 fois par jour) des récepteurs de la prostacycline (IP) qui est structurellement distinct de la prostacycline et il a été approuvé en monothérapie ou en combinaison avec les ERA et les inhibiteurs de PDE5 par la FDA en 2015 ²²². Le sélexipag est rapidement hydrolysé dans le foie en un métabolite à action prolongée qui se lie avec une grande sélectivité aux récepteurs IP, ce qui entraîne la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et les effets anti-inflammatoires ²²². En effet, le ACT-333679 qui est le métabolite actif du sélexipag a une demi-vie d'élimination de 7,9 heures environ tandis que le sélexipag lui-même a une demi-vie de 1 à 2 heures ²²³. Les effets indésirables signalés étaient les maux de tête, la diarrhée et les nausées.

Malgré les avantages de la voie d'administration de ces médicaments, les thérapies à base de prostacycline inhalée actuellement approuvées par la FDA présentent des limites notables telles que la nécessité d'inhalations multiples et de systèmes d'inhalation encombrants qui nécessitent du temps et un entretien quotidiens ^{224,225}.

Ces traitements sont souvent inefficaces et les médecins font recours à des bithérapies ou trithérapies. Des bithérapies associant bosentan plus sildénafil, bosentan plus tadalafil, ambrisentan plus sildénafil et ambrisentan plus tadalafil ont été associées à des améliorations significatives de la classe fonctionnelle, de la capacité d'exercice, de la dyspnée et de la fonction cardiaque droite (suggérant une réduction de l'aggravation clinique). L'association du tadalafil avec le bosentan ou l'ambrisentan semble être associée à une plus grande amélioration hémodynamique qu'une association de sildénafil lorsqu'elle est utilisée à la dose recommandée ²²⁶.

I.5.4. Bloqueurs des canaux calciques

L'augmentation progressive de la pression artérielle pulmonaire observée dans l'HTAP et qui est à la base de la défaillance cardiaque est la cause principale de la mort des patients. Les inhibiteurs calciques sont des médicaments administrés par voie orale ou intraveineuse, qui peuvent détendre les artères pulmonaires et diminuer la résistance et la pression de ces vaisseaux en perturbant le mouvement du calcium (Ca^{2+}) à travers les canaux calciques ²²⁷. En bloquant les canaux calciques voltage-dépendants dans les vaisseaux sanguins, les bloqueurs de canaux calciques diminuent le calcium intracellulaire, inhibant la contraction des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire ²²⁸. Les traitements connus dans cette classe sont l'amlodipine, le diltiazem, le nifedipine et le felodipine. Cependant, moins de 10 % des patients atteints d'HTAPi évalués dans un centre de référence vasculaire pulmonaire ont répondu à ce traitement. Lors d'un test de vasodilatation aiguë, ces patients ont montré des niveaux significativement plus bas de PAP moyenne et de PVR, qui ont atteint une valeur proche de la normale ²²⁹.

I.5.5. Molécules en essais cliniques

BMPR-II est une voie de signalisation très importante dans le développement de l'HTAP. Le remodelage vasculaire pulmonaire est la conséquence d'un déséquilibre des voies antiprolifératives BMPR2 et les voies pro-prolifératives TGF- β .

Sotatercept est une nouvelle protéine de fusion composée du domaine extracellulaire du récepteur de l'activine humaine de type IIA fusionné au domaine Fc de l'IgG1 humaine ²³⁰. Il se comporte comme un piège à ligands pour des membres de la superfamille du TGF- β tels que l'activine, qui va bloquer la voie de signalisation TGF- β et rétablir ainsi l'équilibre entre les voies de l'activine qui favorisent la croissance et la voie des BMP qui inhibent la croissance. L'essai clinique PULSAR a montré une amélioration significative de la classe fonctionnelle, du test de marche de 6 minutes et des résistances vasculaires pulmonaires chez les patients traités avec le sotatercept ²³⁰. Ces résultats ont été confirmés au cours de l'essai de phase 3 dénommé STELLAR ²³¹.

Le bardoxolone méthyle (BARD) est une thérapie prometteuse pour l'HTAP qui diminue le stress oxydatif et l'activation de NF-kB. Au plan mécanistique, le méthyle active le facteur 2 lié au facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf2) qui va bloquer ou diminuer l'expression de NF-kB qui est impliqué dans l'inflammation ^{232,233}. Le BARD a augmenté de manière significative le test de marche de 6 minutes chez les patients atteints d'HTAP recevant des thérapies orales de fond contre l'HTAP et a été bien tolérée à des doses allant jusqu'à 10 mg ²³⁴.

Le tocilizumab est un nouvel anticorps monoclonal utilisé principalement dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et qui inhibe de manière compétitive la liaison de l'interleukine-6 (IL-6) à son récepteur (IL-6R) ¹⁷³. L'inflammation est l'un des processus clés de l'HTAP avec notamment une augmentation de l'expression de l'IL-6 chez les patients ^{189,190,235} et dans les modèles expérimentaux d'hypertension pulmonaire ²³⁶. En résumé, le traitement par tocilizumab est faisable dans l'HTAP mais n'a montré aucun effet significatif sur les paramètres hémodynamiques dans l'HTAP héritable ou idiopathique. Cependant, une amélioration potentielle a été notée dans le petit sous-groupe de patients atteints d'HTAP associée aux maladies du tissu conjonctif mais le tocilizumab n'a pas bloqué la signalisation de l'IL-6 dans l'hypertension artérielle pulmonaire ²³⁷.

De nombreux essais cliniques sont en cours dans l'HTAP et les premiers résultats sont prometteurs et pourraient permettre d'améliorer la prise en charge des patients ²³⁸. Cependant, il n'existe toujours pas de traitements prenant en compte le rôle du microbiote dans l'HTAP.

I.6. Les modèles animaux d'HTAP

Pour mieux comprendre certaines pathologies et développer des traitements efficaces, le recours aux modèles reproduisant de façon spontanée ou induite les mécanismes clés de la maladie est indispensable. Les chercheurs s'appuient donc sur les modèles animaux pour comprendre la physiopathologie des maladies et évaluer aussi l'efficacité et la tolérance aux traitements.

Plusieurs modèles sont validés dans le cadre de la physiopathologie de l'HTAP et la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques. Un bon modèle dans cette pathologie doit pouvoir reproduire certains mécanismes fondamentaux de l'HTAP tels que la modification des paramètres hémodynamiques, une atteinte des artérioles pulmonaires sur le plan structurel et fonctionnel associé à un remodelage important, la présence de lésions plexiformes, une inflammation chronique avec des infiltrations périvasculaires de cellules inflammatoires, une diminution des voies de signalisation impliquées dans la vasodilatation avec une augmentation des marqueurs de la vasoconstriction et une augmentation de l'expression de certains facteurs de croissances ou des marqueurs de la prolifération accompagné d'une augmentation des marqueurs de la survie et de la résistance à l'apoptose. Le constat aujourd'hui est qu'il est très difficile de trouver un modèle idéal de l'HTAP qui puisse reproduire de façon exacte tous les mécanismes mentionnés ci-dessus. Pour faire face à cette question, certaines études combinent plusieurs modèles, et bien souvent le modèle à utiliser est choisi en fonction de la question à laquelle on veut répondre.

I.6.1. Modèle induit par la Monocrotaline (MCT) chez le rat

La monocrotaline (MCT) est un alcaloïde pyrrolizidine présent dans les graines des plantes du genre *Crotalaria*. Cette substance peut causer des dommages au foie, aux poumons et aux reins chez divers organismes. La mise en place de ce modèle consiste en l'administration unique sous-cutanée de monocrotaline à la dose de 60mg/kg chez le rat avec un suivi sur 3 à 4 semaines. Le modèle d'hypertension pulmonaire induite par la MCT est un des modèles classiques d'étude de la maladie. L'alcaloïde MCT est activé par le métabolite réactif du pyrrole déshydromonocrotaline (MCTP) dans le foie, une réaction qui dépend fortement du cytochrome *P*-450 (CYP3A4)^{239,240}. Ce modèle expérimentale ressemble à la forme humaine d'hypertension pulmonaire de par sa gravité hémodynamique avec une augmentation significative des PAPm dès la deuxième semaine suivant l'injection, une importante hypertrophie ventriculaire droite avec doublement de l'indice de Fulton et de par sa mortalité particulièrement élevée. Cependant, sa forte composante inflammatoire, la présence d'anomalies multi-organes avec une toxicité hépatique majeure, une perte précoce de la barrière endothéliale, une évolution très rapide sur trois semaines et l'absence de lésions intimes complexes font que ce modèle diffère de l'HTAP. Le mode d'action de la MCT est l'induction de dommages sur les cellules endothéliales pulmonaires. En effet, la perte de protéines membranaires induite par la MCT entraîne l'activation de facteurs prolifératifs et anti-apoptotiques, et la dérégulation de la signalisation de l'oxyde nitrique (NO), entraînant des

modifications vasculaires pulmonaires ²⁴¹. Les dommages initiaux aux cellules endothéliales induits par la MCT ont également été liés dans un premier temps à une activation transitoire des voies de signalisation Smad et au dysfonctionnement de BMPR 2 et à la perturbation de la signalisation BMP, ainsi qu'à l'expression accrue d'éléments intracellulaires impliqués dans la séquestration et l'inhibition de l'activité du BMPR 2 ²⁴². Dans le modèle MCT, l'expression des marqueurs pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α est progressivement augmentée et est 3 à 7 fois supérieure à celle du groupe témoin ²⁴³. La voie de signalisation PI3K/Akt liée à la production de médiateurs inflammatoires est également activée par la MCT dans ce modèle ²⁴³. L'efficacité de ce modèle peut être influencée par les lots de monocrotaline, l'âge et le poids des animaux, ainsi que les conditions environnementales. Le modèle MCT chez le rat est largement utilisé en raison de la facilité d'induction d'HTP sévère avec une seule injection.

I.6.2. Modèle induit par l'hypoxie chronique chez le rat et la souris

Ce modèle consiste en l'exposition des animaux à l'hypoxie (10% fiO₂) normo-barrique ou hypo-barrique de manière chronique pendant trois semaines au minimum. Les modèles actuels de rongeurs d'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie ne sont pas des modèles précliniques appropriés pour étudier la pathologie de l'HTAP. Ceci est particulièrement attribuable à l'absence de caractéristiques pathologiques clés observées dans l'HTAP humaine ²⁴⁴. En effet, ce modèle conduit au développement d'une hypertension pulmonaire modérée associée à une hypertrophie cardiaque droite modérée ²⁴⁵. L'exposition à l'hypoxie induit une vasoconstriction pulmonaire initiale qui serait sur le long terme responsable de l'hyperplasie du muscle lisse et du remodelage vasculaire pulmonaire ²⁴⁶. Il s'agit d'un modèle nécessitant un équipement particulier et il est plus ou moins sévère en fonction des espèces animales utilisées et de l'âge des animaux. L'analyse des réseaux moléculaires à partir du tissu pulmonaire démontre des différences distinctes dans l'expression des gènes induite par l'hypoxie entre les espèces ²⁴⁷. L'exposition chronique à l'hypoxie chez le rat augmente l'expression des gènes impliqués dans la prolifération des cellules endothéliales et diminue l'expression de ceux associés à l'apoptose. Par exemple, le gène de la phosphoinositide-3 kinase (souvent associé à la prolifération et à l'inflammation) était fortement régulé à la hausse (6 fois) dans son expression dans les poumons de rat mais pas dans les poumons de souris ²⁴⁸. Des altérations de la voie du NO, de la prostacycline, de l'ET-1 et du PDGF ont été décrites. On retrouve également des atteintes de la voie de signalisation du BMPR-2. Il a également été montré que l'hypoxie soutenue favorise le développement d'un microenvironnement pro-inflammatoire (moins sévère que dans le modèle MCT) spécifique à l'artère pulmonaire via une régulation à la hausse d'un certain nombre de médiateurs inflammatoires et de molécules

apparentées telles que CXCL12/SDF-1, CXCR4, VCAM-1, ICAM-1 et TGF- β . Ce microenvironnement est propice au recrutement et à la rétention des monocytes/fibrocytes et à leur différenciation en myofibroblastes producteurs de collagène ²⁴⁷. Ce modèle est moins sévère que le modèle MCT car aucune mortalité n'est constatée et la reproductibilité de ce modèle est très satisfaisante. Cependant, tout comme pour le modèle monocrotaline, ce modèle comporte des atteintes multi-organes aux rôles inconnus et est réversible en quelques semaines (3 à 4 semaines) lors de la remise des animaux en normoxie, alors que l'HTAP humaine est irréversible.

I.6.3. Modèle induit par le Sugén + hypoxie

Partant du principe que le *VEGF* est un important facteur de maintien et de différenciation des cellules endothéliales vasculaires, des chercheurs ont conçu des expériences qui avaient pour but d'inhiber la signalisation du *VEGF* ²⁴⁹. Ce modèle consiste en l'administration de 20 mg/kg de SU 5416 par voie sous-cutanée dans la région abdominale de l'animal. Les animaux sont par la suite exposés à l'hypoxie chronique (10% f_{iO_2}) pendant trois semaines, suivi d'un retour en normoxie (21 % O_2) pendant une semaine ²⁵⁰. Le Sugén est un composé exogène qui inhibe la protéine tyrosine kinase 1/2 qui a pour cible le VEGFR1/2, un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Lorsqu'il est administré à des rats en combinaison avec une hypoxie hypobare chronique (Su/Hx), un phénotype d'hypertension pulmonaire sévère se développe avec des lésions angio-oblitérantes comparables aux lésions plexiformes des patients atteints d'HTAP ²⁴⁹. Chez les rats Su/Hx, l'activation de l'inflammasome NLRP3 crée un état inflammatoire qui contribue à l'insuffisance ventriculaire droite. En effet, une augmentation des macrophages du ventricule droit (VD) est associée à une détérioration de sa fonction et à une augmentation de la fibrose de celui-ci dans l'HTAP ²⁵¹.

I.6.4. Modèle d'hypertension pulmonaire sur shunt

L'hypertension pulmonaire sur cardiopathie à shunt est le plus souvent réalisée chez le gros animal : porc, agneau et veau. Un remodelage vasculaire significatif est systématiquement observé, bien que le développement d'une artériopathie occlusive sévère ne soit pas toujours observé ²⁵². C'est un modèle d'augmentation du débit sanguin pulmonaire confiné au lobe shunté ²⁵³. En effet, une anastomose entre l'artère sous-clavière gauche et le tronc artériel pulmonaire chez 30 porcelets pendant 3 mois a induit une augmentation de l'épaisseur médiale de l'artère pulmonaire et des pressions. Aussi, le shunt semble être causalement liée à une

activation du système d'endothéline pulmonaire, avec une augmentation de l'expression de ET-1, ET_B, iNOS et VEGF²⁵⁴.

II. LE MICROBIOTE PULMONAIRE : Généralités, caractérisation et mise en place

II.1. Définitions importantes

II.1.1. Microbiome

Le microbiome est l'ensemble des micro-organismes et leurs gènes vivant dans un environnement particulier. Il se rapporte aux bactéries (éléments primaires) et à leurs gènes (éléments secondaires). Le microbiome contient le microbiote, son « domaine d'activité » mais aussi les conditions environnementales du milieu ^{255,256}.

II.1.2. Microbiote

Née au début du XX^e siècle, la notion de microbiote ou communauté microbienne constitue l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement (le poumon, l'intestin, le sol, etc). Il s'agit de bactéries, de champignons, d'archées, de virus, de phages, de levures, etc. Ces bactéries sont essentiellement des anaérobies strictes (bactéries qui se développent uniquement dans un environnement sans oxygène) dont la culture était impossible pour les chercheurs.

Robert Hungate, un chercheur américain en microbiologie met en place en 1969 une technique (la méthode "Hungate") encore utilisée aujourd'hui pour cultiver les bactéries (anaérobies strictes) du rumen chez le bovin ²⁵⁷.

Dans les années 2000, plusieurs questions sur le rôle et le mode de fonctionnement du microbiote sont soulevées. Des chercheurs de l'institut Micalis, ont développé un outil (Métafun, plateforme de clonage-phénotypage haut débit) permettant de comprendre le rôle de certains gènes du microbiote dans les cellules humaines. C'est la naissance de la métagénomique quantitative et fonctionnelle qui a permis de comprendre le lien entre microbiote et santé de l'hôte. La comparaison des microbiotes de malades et ceux de sujets sains avec les outils de la métagénomique quantitative et fonctionnelle permet dans un premier temps de faire un constat sur l'abondance ou la diminution de certains genres bactériens et dans un second temps d'identifier les mécanismes d'interaction entre les cellules et les microorganismes, et leurs conséquences dans la maladie.

Les animaux axéniques, élevés en milieu stérile et dépourvus de microbiote ont été mis au point pour mieux élucider ce lien hôte-microbiote. En leur implantant un microbiote de patient malade, on observe parfois qu'ils développent à leur tour les symptômes de la maladie.

En 2010, avec l'arrivée des techniques de séquençage à haut débit, le génome de nombreux micro-organismes est séquencé. La revue Nature, dans une étude intitulée « Our other genome » pour faire allusion à notre « autre génome » qui était jusque-là méconnu, va apporter des

connaissances importantes sur la composition et la richesse du microbiote intestinal humain. Les bactéries intestinales humaines représentent la grande majorité du microbiote, comptant plus de 10^{13} cellules et codant pour plus de trois millions de gènes, alors que le génome humain n'en comprend que 23 000. Les connaissances actuelles sur le microbiote intestinal se concentrent principalement sur le microbiote fécal, car il est facile à acquérir, présente une charge microbienne élevée (10^{11} – 10^{12} unités formant colonies par ml) et reflète parfaitement la composition du microbiote du côlon ²⁵⁸. La question qui anime alors la communauté scientifique est la suivante : avons-nous tous le même microbiote ou un microbiote différent et si oui, à quel pourcentage ? L'hypothèse fut qu'il existe un « microbiote moyen » humain avec une composition relativement identique en microorganismes entre les individus.

II.1.3. Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) : notion de taxonomie

Une Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU en anglais pour Operational Taxonomic Unit), est une définition opérationnelle utilisée pour regrouper des individus phylogénétiquement proches. Le terme a été créé par Robert R. Sokal et Peter H. A. Sneath dans le contexte de la taxonomie numérique, et désigne un groupe d'individus étudiés, présentant des similarités. En microbiologie, le terme OTU est fréquemment utilisé pour définir un ensemble de bactéries similaires à plus de 97% dans leurs séquences et regroupé par clustering. L'OTU est donc l'unité de mesure la plus communément utilisée pour quantifier la biodiversité microbienne basée sur les gènes, principalement de l'ARNr 16S pour les bactéries et les archaea.

Il existe deux approches principales de la sélection OTU. Le plus couramment utilisé est la sélection OTU *de novo*, qui compare toutes les séquences les unes aux autres et les regroupe par similarité sans référence à des sources de données extérieures. L'autre approche de la sélection OTU est basée sur la taxonomie, où des outils tels que BLAST comparent les séquences à une base de données et regroupent les OTU en fonction de leurs homologies de séquence avec les séquences connues dans la base de données ²⁵⁹.

II.1.4. Variant de séquence d'amplicon (ASV)

Le variant de séquence d'amplicon (ASV en anglais pour **amplicon sequence variant**) est un terme utilisé pour désigner des séquences d'ADN individuelles récupérées à partir d'une analyse de gène marqueur à haut débit à la suite de l'élimination de séquences parasites générées pendant l'amplification par PCR et le séquençage qui s'en suit. Alors que les approches OTU

tendent de masquer des séquences similaires en une séquence consensus abstraite, minimisant ainsi l'influence de toute erreur de séquençage dans le pool de lectures, l'approche ASV tente d'aller dans la direction opposée. L'approche ASV commencera par déterminer quelles séquences exactes ont été lues et combien de fois. Ces données seront combinées avec un modèle d'erreur pour l'exécution du séquençage, permettant la comparaison de lectures similaires pour déterminer la probabilité qu'une lecture donnée à une fréquence donnée ne soit pas due à une erreur du séquenceur ²⁶⁰.

Suite à ce calcul, les séquences sont filtrées en fonction d'une certaine valeur seuil de confiance, laissant derrière elles une collection de séquences exactes ayant une confiance statistique définie. Parce qu'il s'agit de séquences exactes, générées sans regroupement ni bases de données de référence. Les résultats de l'ASV peuvent être facilement comparés entre les études utilisant la même région cible. De plus, une séquence de gène cible donnée doit toujours générer le même ASV et un ASV donné, étant une séquence exacte, peut être comparé à une base de données de référence à une résolution beaucoup plus élevée permettant une identification plus précise jusqu'au niveau de l'espèce ²⁶¹. Les ASV, étant des séquences exactes, permettent une détection simple de séquences chimériques sans l'effet de biais potentiel d'une base de données de référence ²⁶².

Cependant, il est admis que les génomes bactériens individuels ont souvent plusieurs gènes d'ARNr 16S qui ne sont pas identiques et qu'une séquence de gène d'ARNr 16S pourrait être trouvée avec différentes versions de la séquence dans différents génomes ²⁶³. Cela pourrait conduire au problème que les ASV et l'utilisation d'un seuil trop fin pour identifier les OTU pourraient diviser un seul génome en plusieurs clusters. Les partisans des ASV minimisent les craintes que la plupart des génomes bactériens aient plus d'une copie *durrrn* opéron et que ces copies ne sont pas identiques ^{261,264}. À l'inverse, l'utilisation d'un seuil trop large pour définir les OTU pourrait regrouper plusieurs espèces bactériennes dans la même OTU. Un exemple des deux est vu dans la comparaison de *Staphylococcus aureus* (NCTC 8325) et *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), où chaque génome possède 5 copies du gène de l'ARNr 16S. Chacune des 10 copies du gène de l'ARNr 16S dans ces deux génomes est distincte et elles représentent 10 ASV. Inversement, si les copies étaient regroupées à l'aide d'un seuil de distance de 3 %, les 10 ASV se regrouperaient dans la même OTU ²⁶⁵. Lors d'une tentative d'étude de séquences à faible abondance, les OTU sont généralement comme beaucoup plus susceptibles de conserver des séquences rares, bien que cela se fasse au prix d'une détection plus élevée des fausses OTU ²⁶⁰.

II.1.5. Métagénome

Le métagénome est l'ensemble constitué par le génome humain et le microbiome. Au niveau pulmonaire, ce terme va regrouper l'ensemble du génome humain et celui des microorganismes résidents dans le poumon ou dans les voies aériennes du poumon.

II.1.6. Calcul de la diversité alpha du microbiote pulmonaire

La proportion et le nombre d'espèces d'un écosystème donné ont longtemps été les paramètres permettant de mesurer la biodiversité. Cependant, la notion de biodiversité étant très complexe, ces paramètres ont rapidement montré leurs limites.

II.1.6.1. Indice de Shannon

L'indice de Shannon est un indice permettant de mesurer à la fois la richesse spécifique (nombre d'espèce dans le milieu) et l'abondance relative (la répartition des individus) des espèces dans un environnement donné.

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

H' : indice de biodiversité de Shannon

i : une espèce du milieu d'étude

S : richesse spécifique

P_i : Proportion d'une espèce i par rapport au nombre total d'individus (N) dans le milieu d'étude, qui se calcule de la façon suivante : $P(i) = (n)i / N$; avec $(n)i$ qui correspond au nombre d'individus pour l'espèce i et N qui représente l'effectif total (les individus de toutes les espèces).

II.1.6.2. Indice de Simpson

Créé par Edward Simpson en 1949, l'indice de Simpson permet de mesurer la diversité d'un milieu à travers le calcul de la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce. Plus globalement, cet indice mesure le degré de concentration d'individus classés en catégories.

II.2. Origine et caractéristiques du microbiote pulmonaire

Les voies respiratoires ou voies aériennes sont constituées de l'ensemble des organes qui permettent le passage de l'air entre l'extérieur du corps et les poumons, depuis le nez et la bouche jusqu'aux alvéoles pulmonaires, au cours de la respiration. Elles comprennent les voies aériennes supérieures qui sont extra-thoraciques (les fosses nasales, la cavité buccale, le

pharynx et le larynx) et les voies aériennes inférieures qui sont intrathoraciques (trachée, bronches souches et lobaires, bronchioles) ²⁶⁶ (Figure 11).

L'origine du microbiote pulmonaire et des voies respiratoires supérieures reste très complexe. Certaines études soutiennent que le microbiote pulmonaire pourrait provenir de la flore endogène intestinale et de l'environnement ²⁶⁷. Chez les individus en bonne santé, les bactéries résidant dans les voies respiratoires supérieures et celles de l'environnement externe pénètrent dans les voies respiratoires inférieures ²⁶⁸. Ainsi, ces études ont montré que les sources microbiennes qui alimentent la niche pulmonaire sont multiples : le réservoir bucco-dentaire en premier lieu, le réservoir digestif et l'air inhalé.

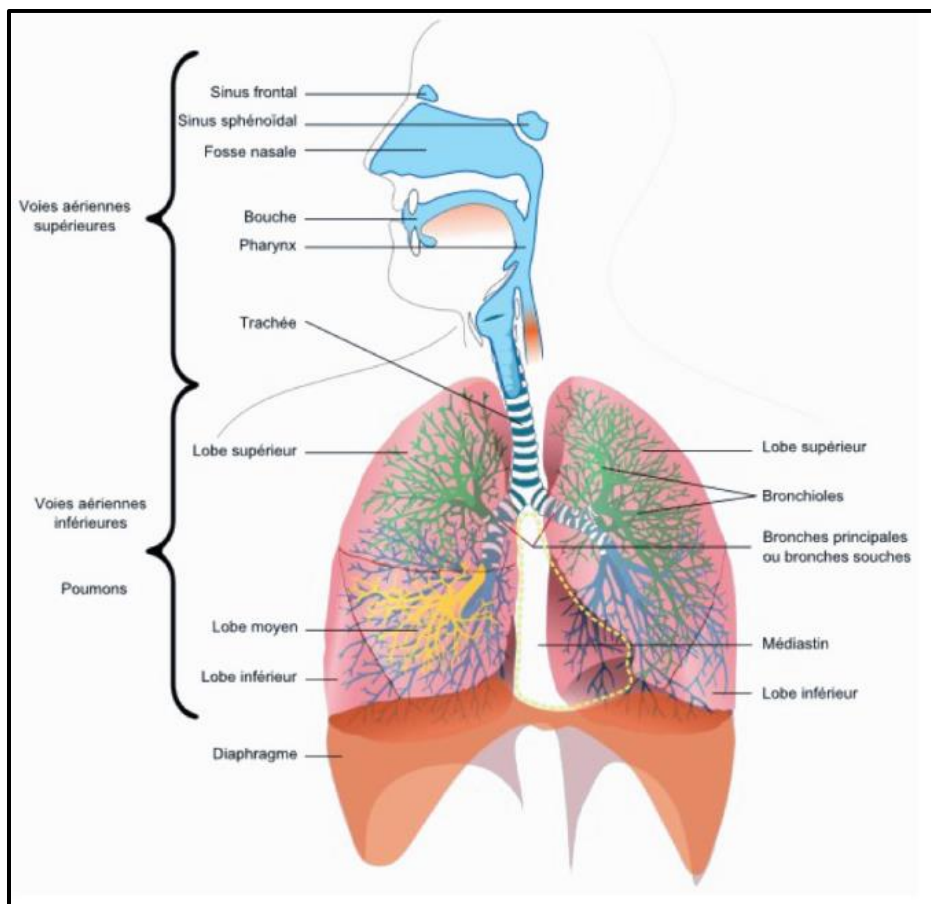


Figure 11 : Voies respiratoires supérieures et inférieures chez l'Homme

(<https://blogglophys.wordpress.com>) ²⁶⁶

Le microbiote pulmonaire est donc la résultante d'un équilibre entre immigration (par inhalation, micro-aspiration, dispersion à partir de la muqueuse oropharyngée) et élimination (par l'ascenseur muco-ciliaire et la toux, sélection d'origine immunitaire ou du fait des facteurs abiotiques locaux, compétition entre micro-organismes) (Figure 12) ²⁶⁹. Tous ces éléments expliquent les caractéristiques bien particulières du microbiote pulmonaire bactérien que l'on peut résumer en 3 points :

- ✓ **Une faible densité bactérienne** estimée dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) chez l'adulte et de l'ordre de 20 à 1200 bactéries pour 1000 cellules humaines dans le parenchyme pulmonaire ^{270,271}.
- ✓ **Une forte biodiversité**, malgré une faible richesse en taxons bactériens du microbiote pulmonaire par rapport au microbiote intestinal. Sa diversité est bien supérieure à celle du microbiote intestinal (alpha-diversité mesurée par l'indice de Shannon 3,3 *versus* 2,5 pour le microbiote intestinal) ²⁷²
- ✓ **Une grande abondance en bactéries anaérobies strictes** représentée par les Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria et Actinobacteria ^{273,274}.

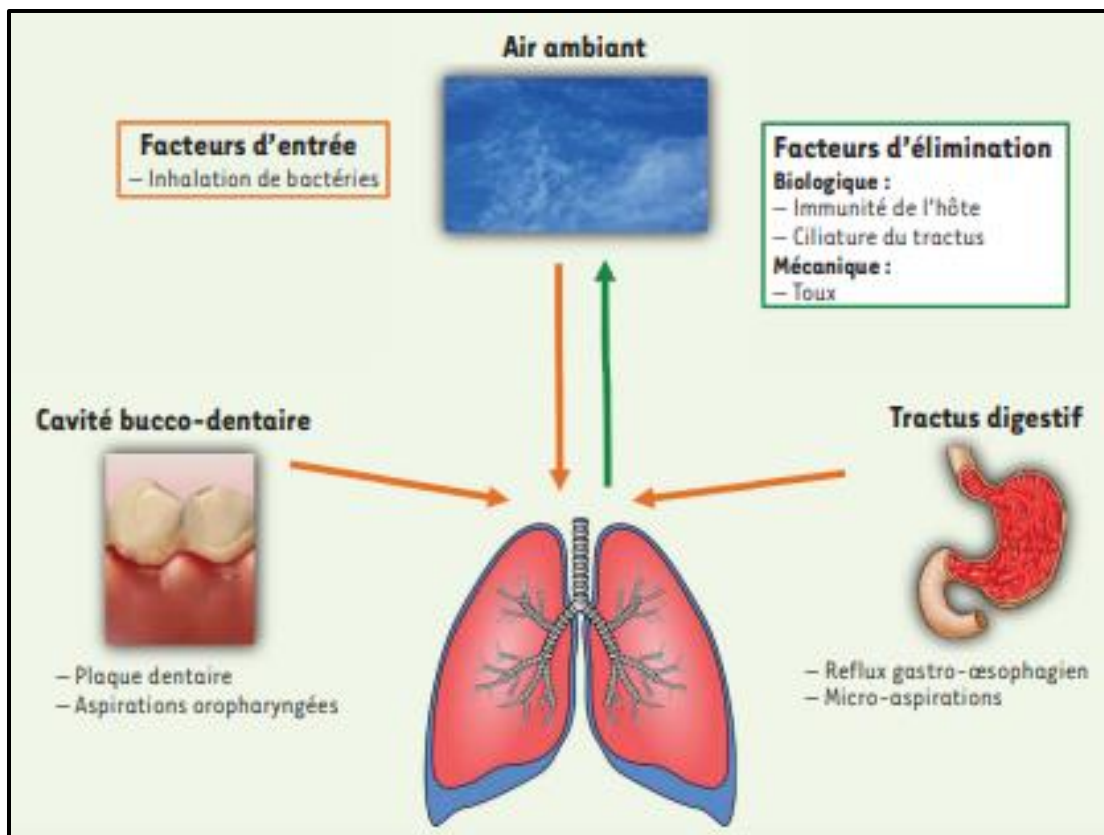


Figure 12 : Facteurs d'entrée/sortie des anaérobies dans les poumons.

(Guilloux et al. 2018) ²⁶⁸

II.3. Caractérisation du microbiote pulmonaire

Le poumon a longtemps été considéré comme stérile car les méthodes classiques de culture bactérienne ne permettaient pas d'isoler les bactéries pulmonaires qui sont pour la plupart des anaérobies strictes, ce qui n'est pas cohérent avec la fonction du poumon qui est un organe d'échange gazeux. L'apparition des techniques modernes permettant de s'affranchir de la culture a permis de non seulement prouver la présence de bactéries dans le poumon au même titre que l'intestin mais également de caractériser ce microbiote résident. L'identification de

l'ARN ribosomal 16S (un gène bactérien universel), l'amélioration progressive des techniques de séquençage et le développement d'outils de bio-informatique puissants pour les calculs permettent aujourd'hui de mieux identifier ces micro-organismes ²⁷⁵. Universellement présent chez tous les procaryotes, le gène codant l'ARN 16S a une longueur d'environ 1,5 kilobases et comporte neuf régions hypervariables (V1 à V9) entourées de dix régions hautement conservées (C1 à C10) ²⁷⁶. La description de la population bactérienne peut aller jusqu'au genre ou à l'espèce, via la caractérisation des OTU présents dans un échantillon.

Le microbiome pulmonaire est essentiellement composé de bactéries (ou bactériome). Nous avons également une communauté fongique (ou mycobiome), de virus et de phages (virome), pour lesquelles les connaissances sont très limitées. Les résultats restent très variables en fonction des publications en ce qui concerne les différents phyla qui composent le microbiote pulmonaire d'un individu sain. Il diffère de façon constitutive en fonction de l'âge, du sexe, de l'origine sociale et/ou ethnique des patients, et il reste dépendant de facteurs environnementaux et/ou extrinsèques tels que la prise de traitements ou de l'alimentation ^{277,278}. Le mode d'accouchement est un facteur fondamental de variation (quantitative et qualitative) de ce microbiome respiratoire à la naissance ²⁷⁹. Proteobacteria, Firmicutes et Bacteroidetes ont été identifiés comme les phyla les plus fréquents. Au niveau du genre bactérien, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Porphyromonas* et *Veillonella* sont prédominants ²⁷⁶.

II.3.1. Techniques de prélèvement du microbiote pulmonaire

La difficulté majeure des prélèvements des voies respiratoires basses est la contamination par la flore oropharyngée ou les autres flores des voies aériennes supérieures. Il est donc nécessaire de bien réaliser le prélèvement du microbiote pulmonaire afin d'éviter ou de minimiser la contamination salivaire. Il existe différents types d'échantillonnages en fonction des sites de prélèvement.

II.3.1.1. Lavage bronchoalvéolaire

Effectué sous endoscopie, le LBA est très invasif. Il consiste à injecter, puis à ré-aspirer du sérum physiologique via un fibroscope placé dans une bronche sous-segmentaire (de 3^e ou 4^e génération). Des échantillons de 50 ml de sérum physiologique (à 37 °C) sont instillés en 4 à 6 fois, puis récupérés par aspiration, permettant de recueillir entre 20 et 60 % de la quantité injectée. Le LBA se compose de deux fractions : l'une bronchique qui peut être éliminée (50 ml) en fonction des pathologies examinées et l'autre pré-alvéolaire et alvéolaire (150–200 ml), qui nous intéresse le plus dans le cas de l'HTAP qui est une maladie des micro-

vaisseaux. Il présente l'avantage d'explorer un vaste territoire pulmonaire, les bronchioles distales et jusqu'à 100 millions d'alvéoles. Le seuil de significativité est de 10^4 UFC/ml Il est largement utilisé pour documenter les infections pulmonaires chez le sujet immunodéprimé, associé à certains examens particuliers ²⁸⁰. Le LBA permet surtout de récupérer plus de bactéries nichée dans les bronches.

II.3.1.2. Biopsie chirurgicale pulmonaire

C'est une intervention réalisée par un chirurgien thoracique sous anesthésie générale avec une intubation sélective. La biopsie pulmonaire chirurgicale est réalisée par thoracoscopie (vidéo chirurgie). Après avoir pratiqué 3 incisions de 1 cm, le chirurgien introduit la caméra et deux pinces dans la cavité pleurale qui entoure le poumon. La zone concernée est sectionnée avec une agrafeuse spécifique qui coupe le poumon et scelle les deux berges sectionnées pour éviter les fuites aériennes. La pièce est alors extraite du thorax. Les cicatrices sont refermées avec un fil biodégradable. Des complications très rares telles que des douleurs, des encombrements bronchiques et pneumonie ou encore la formation de caillots dans la plèvre sont à surveiller ²⁸¹. C'est une intervention trop risquée qui ne peut pas se faire en pratique chez les patients HTAP.

II.3.2. Méthodologie d'étude du microbiote pulmonaire

Les méthodes traditionnelles pour étudier le microbiote bactérien reposaient initialement sur des méthodes de culture avec une sensibilité très réduite. Les méthodes de séquençage de nouvelle génération ou Next Generation Sequencing (NGS) de l'ADN bactérien ont considérablement amélioré notre compréhension du microbiote pulmonaire. L'approche la plus utilisée pour évaluer la composition du microbiote est basée sur le séquençage du gène de l'ARN ribosomal [ARNr] 16S en entier ou des régions de celui-ci. Le gène codant pour l'ARN 16S est un gène universellement présent chez les procaryotes (voir II.3.). Toutes les étapes du processus de séquençage, comme les différents protocoles d'extraction ou le choix de la polymérase, des amorces et de la région amplifiée, ont un impact sur la qualité des résultats obtenus ²⁷⁶.

II.3.2.1. Séquençage à haut débit : la stratégie globale ou Shotgun

Le séquençage shotgun est une méthode utilisée pour séquencer des brins d'ADN de façon aléatoires. En complément de l'approche ciblée, qui interroge une région courte et spécifique de gènes ribosomaux, la métagénomique globale est basée sur le séquençage total de l'ADN extrait d'un échantillon par l'approche dite "shotgun". Elle permet de décrire la composition

taxonomique d'une communauté d'organismes et sa diversité, mais aussi ses gènes et donc ses capacités fonctionnelles. La métagénomique globale peut notamment identifier de nouvelles enzymes utiles pour la mise au point de nouveaux antibiotiques. C'était la technique la plus avancée pour le séquençage des génomes jusqu'en 2005. Cette dernière est basée sur la décomposition ou le cisaillement aléatoire de l'ADN en de nombreux et petits fragments chevauchants qui sont séquencés en utilisant la méthode de chaîne pour obtenir des lectures (reads) ²⁸². Ensuite les génomes bactériens sont reconstitués et identifiés à l'aide d'outils de bio-informatique.

II.3.2.2. Approche ciblée : le séquençage de la sous-unité 16S

Le séquençage du gène de l'ARNr 16S a été le premier outil moléculaire à être appliqué à l'étude du microbiote humain. Il donne une description quantitative des bactéries présentes dans un échantillon biologique, permettant l'identification de communautés entières. La petite sous-unité ribosomique ou gène de l'ARNr 16S est un composant hautement conservé de la machinerie transcriptionnelle de toutes les formes de vie à base d'ADN, constitué de régions conservées et variables ²⁸³.

Illumina, PacBio et Oxford Nanopore Technologies (ONT) sont les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) les plus utilisées actuellement. Plusieurs considérations telles que le coût, les taux d'erreurs, les longueurs de lectures (Figure 13), la puissance de la communauté utilisatrice et la capacité d'analyse bio-informatique sont à prendre en compte pour le choix de l'une de ces technologies.

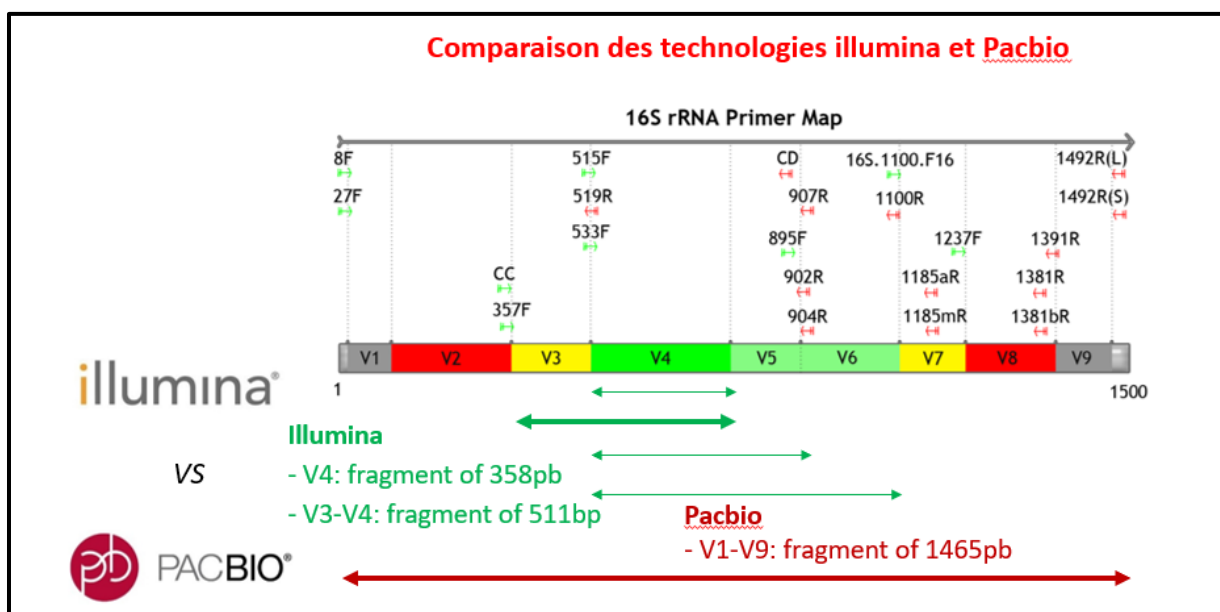


Figure 13 : Comparaison des régions de l'ARN 16S couvertes par Illumina et PacBio

(Yang et Al, 2016)

II.3.2.2.1. Technologie PacBio

Les technologies de séquençage de seconde génération (SGS) ont permis des avancées importantes par rapport au séquençage de Sanger. Cependant, leurs limites, en particulier leurs courtes longueurs de lecture, les rendent mal adaptées et inappropriées à la résolution de certains problèmes biologiques particuliers, notamment l'assemblage et la détermination de régions génomiques complexes, la détection d'isoformes de gènes et la détection de la méthylation ²⁸⁴. PacBio est une technique de séquençage en temps réel d'une seule molécule développée par Pacific BioSciences. Le séquençage PacBio capture les informations de séquence pendant le processus de réplication de la molécule d'ADN cible. Il offre de plus grandes longueurs de lecture (jusqu'à 25 000 paire de bases de longueur) que les technologies de séquençage de deuxième génération (SGS), ce qui le rend bien adapté aux problèmes non résolus dans la recherche sur le génome, le transcriptome et l'épigénétique ²⁸⁵. Il permet de détecter des mutations associées à des maladies par sa capacité à séquencer des régions répétitives étendues. De plus, le séquençage du transcriptome PacBio est optimisé pour l'identification des isoformes de gènes et facilite les découvertes fiables de nouveaux gènes et de nouvelles isoformes de gènes annotés, en raison de sa capacité à séquencer des transcrits de pleine longueur ou des fragments de longueurs significatives. Cette technique permet également de détecter des modifications de base telles que les méthylations ²⁸⁴. Elle est plus coûteuse que la technologie Illumina et présente des taux d'erreurs élevés de 10 à 15 % par rapport à ceux de Illumina qui sont compris entre 0,2 et 0,5 % ²⁸⁶.

II.3.2.2.2. Technologie illumina

En 2006, Solexa a lancé Genome Analyzer (GA). En 2007, la société a été rachetée par Illumina, qui a lancé le HiSeq 2000 début 2010, en utilisant la même chimie de séquençage que GA ²⁷⁵. La technologie Illumina possède le rendement le plus élevé et le coût de réactif le plus bas. Le taux d'erreurs est compris entre 0,2 à 0,5 % et Illumina bénéficie d'un solide historique de soutien de la part de la communauté de la recherche. Cependant, une de ses limites reste la taille de la longueur de lecture qui est de 2 fois 150 paires de bases ²⁸⁶.

Le MiSeq d'Illumina est un séquenceur de paillasse lancé en 2011 qui partage de nombreuses technologies avec HiSeq. Comme HiSeq, il est capable de séquencer des fragments de chaque extrémité, permettant des lectures plus longues, sans manipulation supplémentaire lors de l'étape de séquençage. MiSeq a un taux d'erreur très faible, avec le taux de mutations (*in-del*) le plus bas de tous les séquenceurs de paillasse. De plus, de nombreuses étapes peuvent être

automatisées, y compris la préparation de la bibliothèque, la mesure de la concentration et l'amplification de la matrice ²⁸⁷.

II.3.2.3. Métagénomique

La métagénomique décrit le séquençage direct de l'ADN total extrait d'une communauté microbienne. C'est une approche qui produit de grands volumes de données multidimensionnelles concernant la composition phylogénétique et fonctionnelle du microbiote. La visualisation de ces données est devenue un élément indispensable de l'analyse exploratoire et de la compréhension du rôle du microbiote. Les données brutes obtenues sont analysées par des procédures de contrôle qualité puis traitées à l'aide de logiciels capables de produire différents types d'analyses visant à déterminer les taxons ou les gènes (analyse fonctionnelle). Après l'identification des fragments d'intérêt, ceux-ci sont comparés à des collections de séquences de références ²⁸⁸. Les gènes de références utilisés codent principalement et très majoritairement pour les ARN ribosomiques qui permettent une assignation à une espèce, un genre ou un phylum.

II.3.2.4. Métatranscriptomique

La métatranscriptomique représente l'ensemble des gènes et des fonctions exprimés (les transcriptomes) par les différents microorganismes d'un échantillon. Ces applications ouvrent de nombreux champs tels que :

- Identification de fonctions enzymatiques et voies métaboliques exprimées dans un échantillon.
- Comparaison des niveaux d'expression de gènes entre échantillons ou dans différentes conditions expérimentales.
- Identification des microorganismes impliqués dans l'expression des voies métaboliques d'intérêt.

Les techniques métatranscriptomiques actuelles sont très prometteuses, cependant, il existe encore plusieurs obstacles qui limitent leur application à grande échelle. Premièrement, la forte présence de l'ARN ribosomique peut réduire considérablement la couverture de l'ARNm qui est l'objectif principal des études transcriptomiques. Pour surmonter cela, certains efforts ont été faits pour éliminer efficacement l'ARNr. Ensuite, l'instabilité de l'ARNm peut compromettre l'intégrité de l'échantillon avant le séquençage. Enfin, la différenciation entre l'ARN de l'hôte et l'ARN microbien peut être difficile, malgré l'utilisation de kits d'enrichissement existant sur le marché ²⁸⁹.

II.3.2. Difficultés liées à l'étude du microbiote pulmonaire

Le poumon, composé de plusieurs lobes, offre une surface importante d'environ 75 m² pour la prolifération de microorganismes. Cette surface très grande entraîne une distribution hétérogène des bactéries selon le lobe et le site de prélèvement (Figure 11) ²⁶⁸. Malgré une diversité bactérienne plus riche que celle du microbiote intestinal, le poumon possède une biomasse relativement faible comparé au microbiote intestinal. A cela, s'ajoute plusieurs difficultés liées à l'échantillonnage, aux techniques de séquençage et leurs limites et à l'identification des espèces bactériennes. En effet, les méthodes d'échantillonnage précisent que les brossages bronchiques ou le LBA ne peuvent pas être appliqués dans les études sur les patients HTAP pour des raisons pratiques et éthiques. L'identification de l'ensemble des taxons bactériens présents dans le microbiote pulmonaire représente une autre difficulté car une partie seulement des bactéries présentes sont connues et étudiées.

II.3.3. Description du microbiote pulmonaire

La charge bactérienne dans les voies respiratoires supérieures est environ 100 à 10 000 fois supérieure à celle des voies respiratoires inférieures. La cavité nasale est dominée par les genres *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* et *Moraxella*, et la cavité buccale contient principalement *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria* et *Corynebacterium* ^{290,291}. Cependant, un microbiome assez homogène dominé par *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* et *Fusobacterium* a été décrit chez des individus sains avec une variabilité dans les voies respiratoires inférieures selon le lieu d'échantillonnage, ce qui complique davantage l'analyse ^{290,292} (voir figure 14).

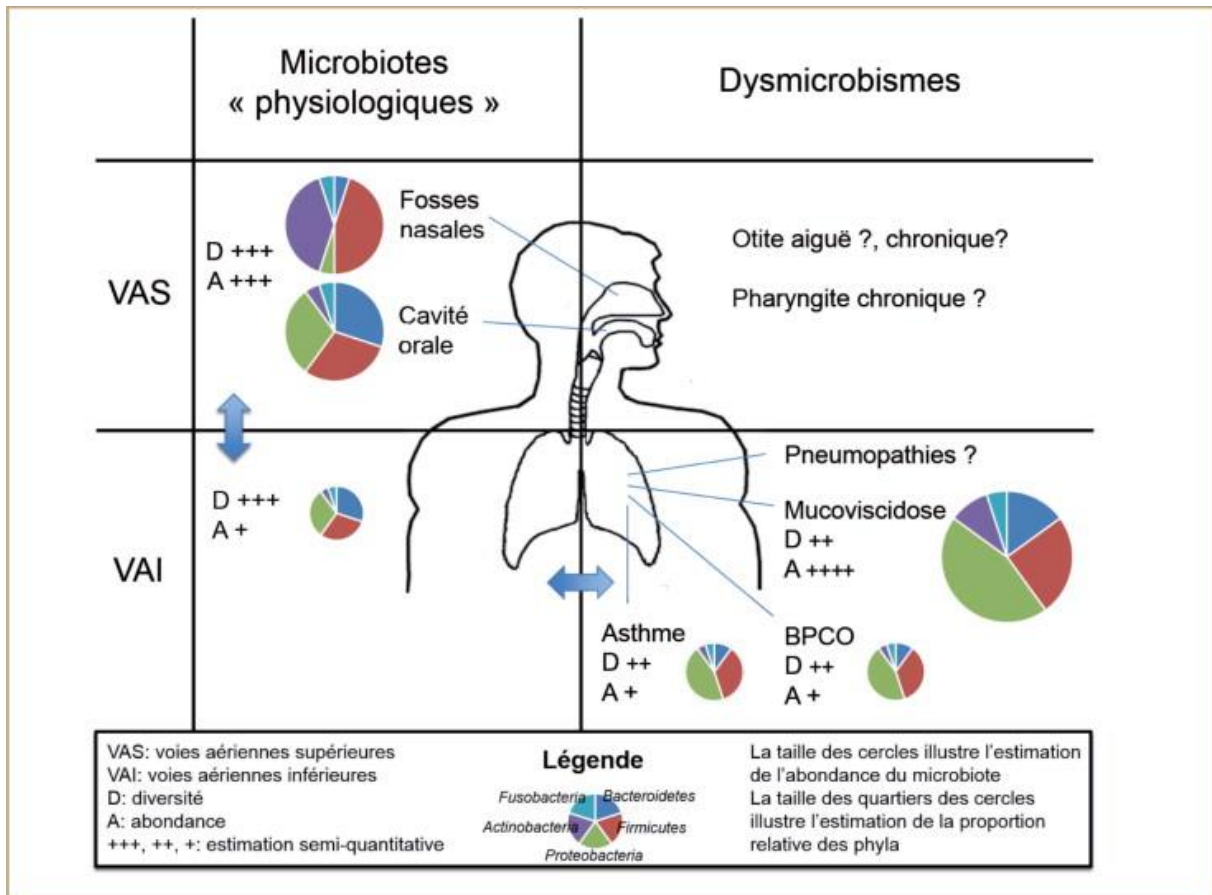


Figure 14 : Représentation schématique de l'abondance et de la diversité selon les microbiotes des voies aériennes supérieures et inférieures en situations physiologiques et pathologiques. (Michon et al 2015)

II.3.3.1. Composition générale du microbiote pulmonaire

Comparé au microbiote intestinal, les données sur la composition des espèces bactériennes du microbiote pulmonaire sont rares. La charge bactérienne totale du poumon, estimée à environ 10^5 unités formant colonies (UFC) par millilitre d'expectoration chez l'adulte sain²⁹³ est répartie sur la surface interne des poumons qui représente 30 fois la surface de la peau²⁹⁴. Avec plus de 200 taxons identifiés, le microbiote du poumon est composé d'environ 50 % de bactéries anaérobies et parmi celles-ci, environ 73 % sont des anaérobies strictes et 27 % des bactéries anaérobies facultatives^{295,296}. La composition de ce microbiote diffère selon la région échantillonnée et le type de prélèvement chez l'adulte. Cependant, il existe un certain chevauchement entre les voies respiratoires inférieures et supérieures chez les enfants²⁹⁷. Les échantillons issus de prélèvements de LBA sont significativement plus riches et plus diversifiés que les échantillons d'écouvillons nasopharyngés^{297,298}. La communauté microbienne est constamment renouvelée et remplacée, mais la plupart des microbes impliqués dans ces flux

appartiennent à quatre phyla. Les principaux phyla bactériens anaérobies retrouvés dans le poumon adulte sont les Bacteroidetes qui représentent environ 50 % de la diversité bactérienne totale, les Firmicutes (environ 30 %) ainsi que les Proteobacteria (environ 10 %) et les Actinobacteria (environ 5 %) ²⁹⁵ (Figure 14).

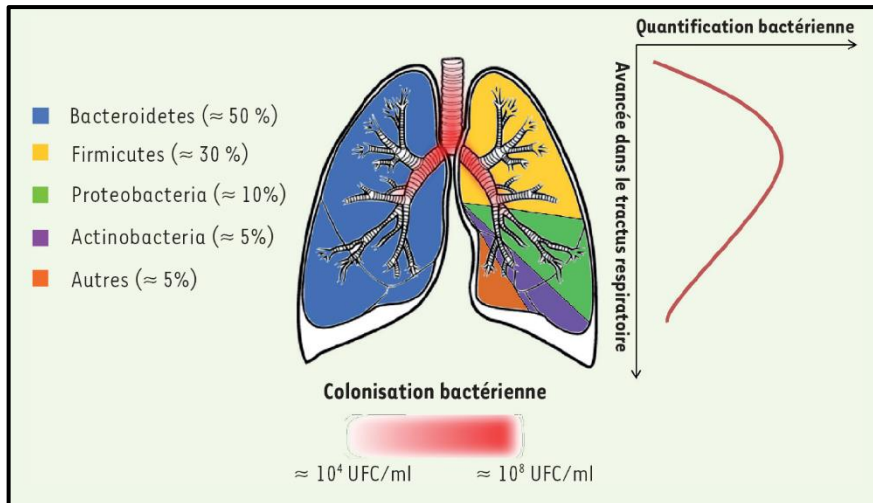


Figure 15 : Principaux phylums bactériens présents dans le poumon sain et densité bactérienne le long du tractus pulmonaire. UFC : unité formant colonies. (Guilloux et al 2018) ²⁶⁸

II.3.3.2. Description des principaux phyla bactériens pulmonaires chez l'homme

II.3.3.2.1. Phylum des Firmicutes

Les espèces de Firmicutes sont des micro-organismes gram-positifs en forme de bâtonnet ou de sphère et se reproduisant par fission binaire. Ce phylum contient des bactéries possédant des caractéristiques adaptées à diverses niches écologiques. Certains membres sont des saprophytes qui vivent dans le sol et les milieux aquatiques, effectuant principalement la décomposition et le recyclage de la matière organique. D'autres sont des commensaux de l'homme dont plusieurs membres sont des agents pathogènes des animaux, de l'homme et des plantes. Ce phylum Firmicutes est divisé en sept classes qui sont : *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Limnochordia*, *Negativicutes*, *Thermolithobacteria* et *Tissierellia* ²⁹⁹.

Les *Bacilli* sont impliqués dans la production de métabolites secondaires importants pour l'homme, des composés organiques avec des propriétés médicinales. Les *clostridies* comprennent des espèces productrices d'acides gras à chaîne courte dans l'intestin humain, tels que le butyrate, ainsi que des espèces provoquant le botulisme, le tétanos, la

gangrène gazeuse, les intoxications alimentaires, la colite pseudomembraneuse et la diarrhée associée aux antibiotiques chez l'homme ³⁰⁰.

II.3.3.2.2. Phylum des Bacteroidetes

C'est le groupe le plus important parmi les bacilles Gram négatifs anaérobies. Ces germes fécaux constituent une partie importante du microbiote intestinal. Le phylum Bacteroidetes comprend plus de 1 500 espèces décrites avec divers rôles écologiques ³⁰¹. Les Bacteroidetes sont généralement des commensaux « amicaux » lorsqu'ils résident dans l'intestin, mais ils ont tendance à devenir des agents pathogènes opportunistes lorsqu'ils sont logés ailleurs. *Bacteroidetes caccae* entraîne une dégradation accrue du mucus, ce qui aide à réduire l'inflammation intestinale en diminuant les interactions bactériennes avec les cellules épithéliales intestinales dans l'intestin en général, et dans la barrière du mucus colique en particulier ³⁰². La prévalence de Bacteroidetes dans l'intestin adulte dépend principalement de différents facteurs tels que l'alimentation, l'environnement et l'utilisation d'antibiotiques ³⁰³. Il a été démontré que les espèces de Bacteroidetes sont répandues dans les intestins des personnes vivant dans les pays occidentaux (Amérique du Nord et Europe), car les régimes alimentaires occidentaux sont souvent riches en matières grasses et en protéines ³⁰⁴.

II.3.3.2.3. Phylum des Actinobacteria

Les actinobactéries sont l'un des quatre principaux phyla du microbiote pulmonaire même si elles ne représentent qu'un faible pourcentage (environ 5%) ²⁶⁸. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont porté l'attention sur les actinobactéries, en particulier sur leur rôle à la fois dans les maladies gastro-intestinales et systémiques et sur leur éventuelle utilisation thérapeutique. En fait, les classes de ce phylum, en particulier les *bifidobacteriaceae*, sont largement utilisées comme probiotiques démontrant des effets bénéfiques dans de nombreuses conditions pathologiques ³⁰⁵.

II.3.3.2.4. Phylum des Proteobacteria

Initialement appelées "bactéries pourpres et apparentées", le phylum Proteobacteria a été nommé en l'honneur du dieu grec Proteus, pour sa capacité à se métamorphoser et changer de forme, étant donné la grande diversité des formes que l'on retrouve. Le groupe contient de nombreuses et importantes bactéries, y compris des pathogènes, fixatrices d'azote. Toutes les

protéobactéries sont Gram négatives. La plupart sont des anaérobies, mais il existe de nombreuses exceptions. Les protéobactéries ont été initialement divisées en cinq groupes principaux : *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* et *Epsilonproteobacteria*. A partir de 2020, quatre autres classes ont été décrites. Il s'agit des *Zetaproteobacteria*, les *Acidithiobacillia*, *Hydrogenophilalia* et *Oligoflexia* ³⁰⁶.

II.4. Mise en place du microbiote pulmonaire

La mise en place du microbiote pulmonaire pourrait avoir plusieurs origines allant de l'âge gestationnel à la naissance tout en étant influencée par notre mode et environnement de vie. Contrairement à d'autres microbiotes comme celui de l'intestin, le microbiote pulmonaire se développerait avant la naissance au sein de la poche amniotique notamment dans les voies aériennes supérieures. Des études ont rapporté la présence d'ADN bactérien dans le placenta et le liquide amniotique de la mère. Le mode d'accouchement influencerait la composition future des micro-organismes présents dans le microbiote pulmonaire ³⁰⁷. En effet, à la naissance et dans les 5 minutes qui suivent, des communautés microbiennes peuvent être détectées dans la cavité orale et le nasopharynx des nouveau-nés ³⁰⁸. Dès la naissance, le nouveau-né est exposé pour la première fois à un large éventail de microbes provenant de diverses sources, y compris les bactéries maternelles de la peau et du vagin. Il s'agit de plusieurs espèces du microbiome oral, notamment *Prevotella tanneri* et des espèces non pathogènes de *Neisseria* ^{309,310}. Le microbiote des voies respiratoires inférieures mûrit et évolue au cours des 2 premiers mois postnataux avec une diversité qui augmente progressivement avant d'atteindre la stabilité ³¹¹. La colonisation se poursuit après la naissance avec des variations de populations bactériennes selon le mode d'accouchement vécu, par voie basse ou césarienne. Enfin, la mise en place de ce microbiote est fortement influencée par l'environnement et l'air respiré. Des facteurs environnementaux tels que le mode le type d'alimentation et les traitements antibiotiques peuvent influencer la composition du microbiote des voies respiratoires supérieures ^{308,308,312,313}. Le microbiote pulmonaire varie également chez des patients présentant différentes pathologies et selon le stade de la pathologie ³¹⁴. Trois grands mécanismes permettent de contrôler la composition du microbiote pulmonaire et d'assurer son équilibre. Il s'agit de l'immigration microbienne, l'élimination microbienne et les taux de reproduction relatifs de ses membres (Figure 16) ³¹⁵.

- L'immigration est assurée par des micro-aspiration permettant l'entrée de micro-organismes provenant de l'intestin et de micro-organismes de l'environnement du sujet par inhalation.

- L'élimination des micro-organismes pathogènes du poumon se fait par une action mécanique avec le mouvement des cils.
- La reproduction quant à elle conduit à l'installation et à la croissance des espèces déjà présentes dans le poumon.

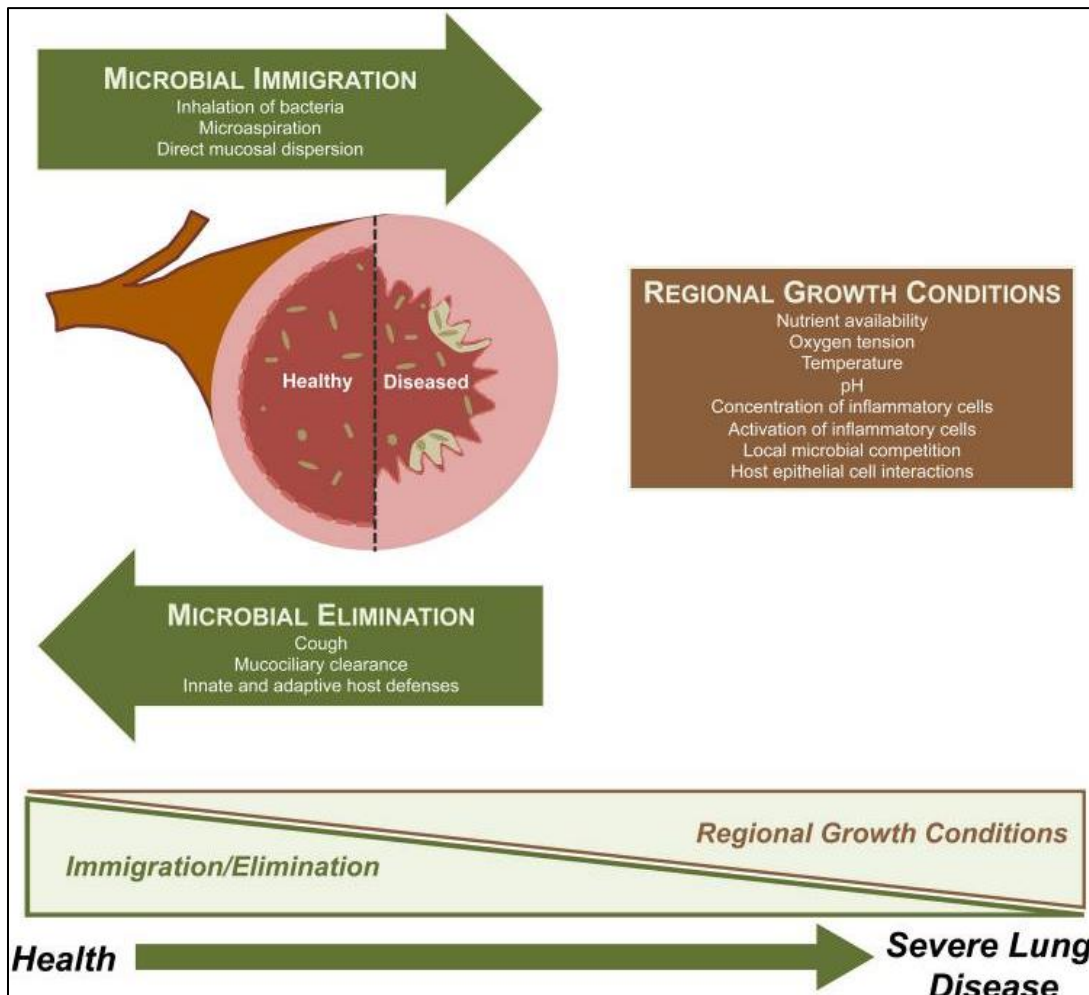


Figure 16 : Facteurs influençant le microbiote pulmonaire.

(Dickson et al 2014) ³¹⁵

II.4.1. Mode d'accouchement

Des études ont décrit le transfert du microbiote des mères aux bébés humains pendant la naissance, montrant que le microbiote vaginal de la mère fournit une première exposition microbienne naturelle aux habitats corporels du nouveau-né. En effet, au moment de l'accouchement, le microbiote intestinal du nouveau-né est acquis en avalant des microorganismes anaux ou vaginaux maternels ³¹⁶ créant ainsi une communauté bactérienne provenant de la mère. Ainsi le microbiote du bébé est significativement plus similaire au

microbiote de sa mère qu'au microbiote des autres bébés nés par voie basse d'autres mères ³¹⁷. Cependant, pour les naissances par césarienne, une des conséquences est que le bébé ne transitant plus par le vagin ne sera plus en contact direct avec le microbiote vaginal et anal ³¹⁷. Une étude de l'ARN 16S des mères et de leurs nouveau-nés (nés par voie vaginale ou par césarienne) ont été échantillonnés. Chez les mères, la peau, la muqueuse buccale, et le vagin ont été échantillonnés 1 heure avant l'accouchement. La peau, la muqueuse buccale et l'aspiration nasopharyngée des nouveau-nés ont été échantillonnés à 5 minutes et le méconium à 24 heures après l'accouchement. Les résultats montrent que les nourrissons nés par voie basse présentent des communautés bactériennes ressemblant au microbiote vaginal de leur mère tandis que chez les nourrissons nés par césarienne, on notait des communautés bactériennes similaires à celles trouvées à la surface de la peau ³⁰⁸.

II.4.2. Facteurs environnementaux

Les voies respiratoires sont constamment exposées aux spores fongiques, mais la plupart des individus en bonne santé avec un système immunitaire intact les éliminent efficacement ³¹⁸. Un environnement différent impacte considérablement le microbiote pulmonaire. Des chercheurs ont démontré que les bactéries pulmonaires murines sont variables et regroupées selon l'environnement, et l'exposition aux antibiotiques influence la sensibilité aux maladies pulmonaires inflammatoires ³¹⁹. Dans une étude réalisée chez les murins, les poumons des souris d'origine sauvage contenaient un plus grand nombre de séquences de *Corynebacteriaceae* et de *Microbacteriaceae*, mais moins de séquences d'Actinobacteria et de Firmicutes ³²⁰. Une autre étude montre que les changements environnementaux (ajout de matériaux de litière) modulent également la composition de la communauté bactérienne du microbiome pulmonaire au début de la vie chez des souris néonatales, alors que les microbes pulmonaires des adultes montrent une plus grande résilience aux variations environnementales ³²¹. Nous pouvons donc conclure que l'influence des facteurs environnementaux sur le microbiote pulmonaire est plus importante chez les nourrissons ou au début de la vie ³²¹. L'âge avancé et la malnutrition sont associés à un microbiote intestinal et pulmonaire dysbiotique, ainsi qu'à une perte de résilience et à une compartimentation des espèces microbiennes dans l'intestin et le poumon ³²².

II.4.3. Axe intestin-poumon

Il a été démontré qu'il existe une interférence/communication entre le microbiote intestinal et les poumons, et la connexion a été nommée « axe intestin-poumon »³²³. Cet axe très évoqué dans la mise en place du microbiote pulmonaire comprend des connexions anatomiques, systémiques et du système nerveux qui interviennent dans les échanges réciproques de signaux microbiens entre le poumon et l'intestin. La translocation bactérienne via le reflux de l'oropharynx serait assurée par cet axe. En effet, avec les multiples reflux auxquels notre organisme est exposé, de nombreuses communautés bactériennes du tube digestif peuvent remonter vers les voies respiratoires supérieures et ensuite vers les poumons par micro aspiration. Il a été mentionné que des troubles du microbiote intestinal de l'homme et de la souris influencent la susceptibilité aux maladies allergiques des voies respiratoires^{322,324}. Plusieurs études ont montré les effets de la colonisation de l'intestin par des bactéries administrées par voie orale, sur la fonction pulmonaire. En effet, le gavage oral par des suspensions fécales chez des souris qui ont d'abord été traitées avec des antibiotiques a permis d'améliorer à court terme certains paramètres, mais pas tous, dans un modèle d'infection à *S. pneumoniae*³²⁵. Chez la souris, il a été montré que de grandes quantités de fibres alimentaires régulent le système immunitaire dans les poumons, par une augmentation surprenante de l'hématopoïèse des cellules dendritiques, les rendant incapables de réactiver les T auxiliaire de type 2, les cellules effectrices, ce qui réduit l'inflammation allergique des voies respiratoires³²⁶. En somme, ces résultats suggèrent que l'épithélium de l'hôte et d'autres cellules structurelles et immunitaires assimilent les informations des micro-organismes et de la réponse concomitante des cytokines locales pour atténuer les réponses inflammatoires et façonner les réponses immunitaires au niveau des sites distaux, tels que les poumons³²⁶.

Chez les nourrissons, la colonisation par *Clostridium difficile* à l'âge d'un mois était associée à une respiration sifflante et à de l'eczéma tout au long de la petite enfance, et à de l'asthme après 6 à 7 ans³²⁷. Des preuves indiquent que chez des souris axéniques souffrant d'infections pulmonaires bactériennes et virales aiguës, les réponses immunitaires et la survie ont été améliorées par l'administration d'AGCC, de composants microbiens (PAMP, par exemple LPS) ou de probiotiques. Dans la plus part des cas, toutes ces substances ont été administrées par voie orale et des résultats en faveur d'une amélioration ont été aussi bien observés dans l'intestin que dans le poumon³²⁸. Il a également été rapporté que les lipopolysaccharides (LPS) et les AGCC jouent un rôle important dans la régulation du tonus immunitaire des poumons via leurs récepteurs (GPR41 et GPR43) qui sont exprimés dans les cellules primaires alvéolaires³²⁹. Des preuves de fonctionnement de l'axe intestin-poumon dans les deux directions ont été

rapportées. Ainsi, des infections pulmonaires virales chez la souris pourraient provoquer également une dysbiose intestinale ³³⁰.

Une association entre le microbiote intestinal et le cancer du poumon a été décrite. En effet, un nombre réduit d' Actinobacteria et de *Bifidobacterium* a été associé au cancer du poumon ^{331,332}. Dans une autre étude, des nombres réduits d' *Enterobacter*, *Dialister*, *Kluyvera*, *Escherichia – Shigella*, *Fecalibacterium* et des nombres plus élevés de Bacteroidetes et *Veillonella* ont été trouvés chez les patients atteints d'un cancer du poumon par rapport au groupe témoin ³³³. Un profilage du microbiome chez 338 patients atteints de cancer du poumon a révélé une augmentation d' *Akkermansia muciniphila* dans les selles. *Akkermansia* a été associé à une augmentation des taux de réponse objective et de la survie globale dans les analyses multivariées indépendamment de l'expression de PD-L1, des antibiotiques et de l'indice de performance ³³⁴.

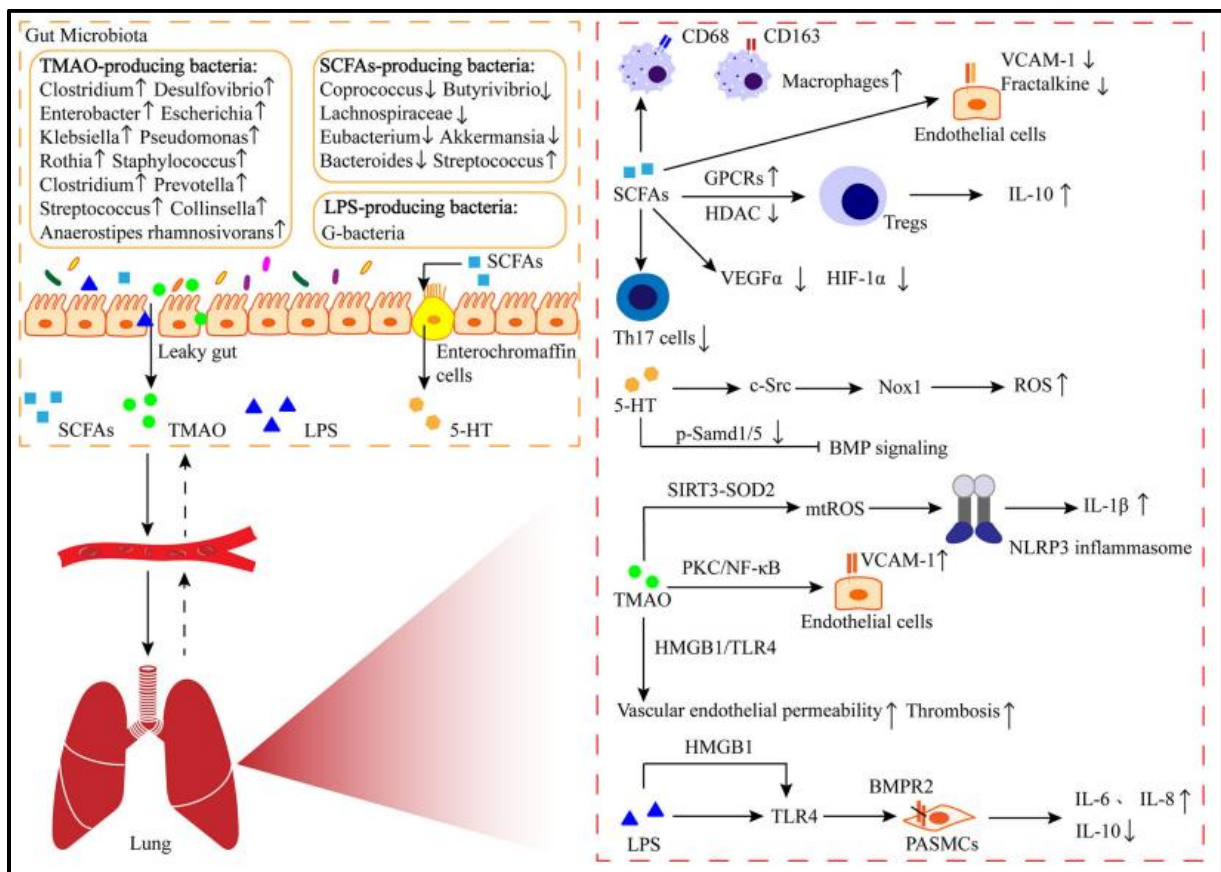


Figure17 : L'axe intestin-poumon dans l'HTAP

(Huang et al. 2022) ³³⁵

Les AGCC ont la capacité à pénétrer dans les poumons par la circulation, où ils sont impliqués dans la régulation immunitaire et jouent un rôle dans l'inflammation périvasculaire et le remodelage vasculaire pulmonaire.

5-HT : sérotonine ; TMAO : N-oxyde de triméthylamine ; LPS : lipo-polysaccharide ; GPCR : récepteur couplé aux protéines G ; HDAC : histone désacétylase ; VCAM-1 : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 ; VEGF α : facteur de croissance endothélial vasculaire α ; HIF-1 α : facteur 1 α inductible par l'hypoxie ; Nox-1 : NADPH oxydase-1 ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SIRT3 : sirtuine 3 ; SOD2 : superoxyde dismutases ; NLRP3 : domaine pyrine de la famille des récepteurs nod-like contenant 3 ; PKC : protéine kinase C ; NF- κ B : facteur nucléaire-kappa B ; HMGB1 : coffret groupe grande mobilité-1 ; TLR4 : récepteur de type péage 4 ; BMPR2 : récepteur de protéine morphogénétique osseuse 2.

II.5. Les fonctions connues du microbiote pulmonaire

La majeure partie des connaissances sur le rôle du microbiote pulmonaire sont issues d'études réalisées sur le microbiote intestinal qui reste de très loin le plus étudié. De nombreux mécanismes par lesquels le microbiote intestinal influence l'inflammation de l'hôte et la tolérance aux microbes, le métabolisme des nutriments ainsi que les moyens par lesquels les communautés microbiennes communiquent et s'influencent mutuellement ont été documentés. Les connaissances sur le rôle du microbiote pulmonaire sont donc très loin d'être bien décrites. Cependant, quelques études décrivant le microbiome des voies respiratoires dans différentes pathologies ont apporté des éléments de réponses à cette question fondamentale. Dans cette quête de connaissances sur le rôle du microbiote pulmonaire, les animaux axéniques restent les meilleurs modèles. Ainsi, quatre grandes catégories de fonctions ont été attribuées au microbiote pulmonaire. Son implication dans des fonctions de barrière empêchant l'implantation de micro-organismes exogènes, son rôle dans l'architecture pulmonaire et dans l'immunité ont été décrites.

II.5.1. Rôle du microbiote pulmonaire dans l'architecture pulmonaire

Le développement pulmonaire débute dès la 3^e semaine de grossesse et ne se termine qu'après la naissance vers l'âge de 2 ans³³⁶. L'alvéolisation est un phénomène essentiellement postnatal au cours du développement pulmonaire. Des études ont montré que le microbiote pulmonaire pourrait influencer l'architecture pulmonaire en jouant sur le nombre et la taille des alvéoles mais également sur la production de mucus. Chez les souris axéniques, des modifications anatomiques ont été notées avec une plus grande finesse des parois alvéolaires et capillaires. Après colonisation avec un microbiote pulmonaire, les souris initialement axéniques ont

présenté une plus forte surface d'échanges alvéolaires (densité alvéolaire supérieure avec des alvéoles plus petites mais plus nombreuses) comparées aux souris non colonisées ³²⁰.

II.5.2. Rôle de barrière du microbiote pulmonaire

Ce rôle a été décrit et bien documenté au niveau du microbiote intestinal. Dans l'intestin, le microbiote inhibe l'établissement de la colonisation par des pathogènes entériques et renforce les défenses innées et adaptatives contre les pathogènes qui sont capables d'envahir ce site ³³⁷. Pour étayer cette fonction de barrière, il a été démontré que le microbiote protège contre les infections systémiques et respiratoires par l'intermédiaire d'*Escherichia coli* ³³⁸. En effet, il a été montré que des souris axéniques, plus sensibles aux infections pulmonaires à *Streptococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*, retrouvaient une résistance aux infections après transfert de microbiote par instillation nasale 72 heures avant l'infection ³³⁹. La muqueuse respiratoire constitue donc une barrière physique contre la pénétration microbienne, et la colonisation par le microbiote normal, génère une résistance aux agents pathogènes par la production de bactériocines (peptides antimicrobien produit par des bactéries et capables de tuer d'autres bactéries). Au niveau du microbiote intestinal, des bactéries intestinales commensales, y compris les bactéries filamenteuses segmentées, *Bifidobacterium* spp. et certains membres du phylum Bacteroidetes, induisent la production de peptides antimicrobiens pour lutter contre les micro-organismes pathogènes ³⁴⁰. Des bactéries du genre *Lactobacille* ont été associées à la protection contre les infections virales respiratoires dans plusieurs modèles de maladies en raison de leur rôle établi en tant que médiateurs probiotiques. Cela est matérialisé par une augmentation des populations entériques murines de *Lactobacillus* lors d'une infection par le virus de la grippe ³⁴¹.

Il est bien connu que le dysfonctionnement de la barrière de l'épithélium des voies respiratoires contribue au développement d'allergies, d'hyperréactivité des voies respiratoires et de maladies respiratoires immunologiques. Les AGCC renforcent et restaurent la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Une étude a confirmé que le butyrate et le propionate, deux AGCC produits par les bactéries, rétablissent la fonction de barrière compromise par les cytokines et les acariens des cellules épithéliales des voies respiratoires bronchiques humaines ³⁴².

II.5.3. Rôle du microbiote pulmonaire dans l'immunité

Le système immunitaire est un médiateur des interactions entre le microbiome et l'hôte. Ainsi, pour comprendre le rôle du microbiote, il est plus que nécessaire d'observer ou d'analyser le profil immunitaire des patients et de le comparer aux différents changements de ce microbiote. Dans l'étude des profils d'expression génique des LBA chez 112 greffés pulmonaires, ceux avec des profils d'activation des neutrophiles avaient différents modèles de colonisation microbienne (Firmicutes ou Proteobacteria dominant) par rapport à ceux avec des profils de remodelage à dominante macrophage (Bacteroidetes dominant)³⁴³. Les quatre grands phyla, à savoir les Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria et Proteobacteria ont été cultivés afin d'évaluer leur capacité à stimuler Nod2 qui est impliqué dans l'immunité pulmonaire. En utilisant un rapporteur de cellules HEK *in vitro* exprimant le récepteur Nod2, ils ont constaté que ces bactéries présentaient une large gamme de capacité à activer Nod2, de $2,6 \pm 0,76$ fois (*Eubacterium limosum*) à $36 \pm 1,9$ fois (*Lactobacillus reuteri*) au-dessus des témoins non stimulés³²⁸.

Les cytokines font partie des molécules effectrices et messagères les plus importantes du système immunitaire. Elles contribuent aux réponses immunitaires lors d'une infection et aux différents mécanismes inflammatoires en protégeant ou en favorisant le développement des maladies telles que l'allergie, l'auto-immunité et le cancer. La manipulation des voies des cytokines est donc l'une des stratégies les plus efficaces pour traiter diverses maladies. Une étude a montré sur un modèle de souris axéniques et allergiques que l'inhalation d'une souche non pathogène d'*Escherichia coli* avait un effet protecteur à long terme vis-à-vis de l'inflammation liée à la réaction allergique par une action sur les cellules dendritiques³⁴⁴. L'augmentation de la production pulmonaire de granulocytes-macrophages en réponse à l'infection par *Streptococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae* est amorcée par le microbiote via l'interleukine-17A³²⁸.

Il a été montré sur un modèle de cellules dendritiques que des souches d'*H. influenzae* et de *M. catarrhalis*, des espèces impliquées dans des infections respiratoires, pourraient entraîner une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, à la différence de souches de *Prevotella* du microbiote respiratoire des sujets sains³⁴⁵. Or, ces processus inflammatoires sont une composante systématique et importante de la physiopathologie des maladies respiratoires chroniques telles que l'HTAP, la mucoviscidose ou la BPCO mais aussi des pathologies respiratoires allergiques. Ainsi, un microbiote « sain » pourrait nous protéger de l'inflammation provoquée par la réaction allergique et un dysmicrobisme (ou dysbiose) pourrait lui-même provoquer une inflammation locale à l'origine de l'altération du tissu pulmonaire.

Une étude a montré que la colonisation des poumons n'avait pas d'effet majeur sur la teneur en cellules immunitaires entre rats axéniques et rats conventionnels et que les niveaux de LB et LT (CD4 et CD8) étaient sensiblement les mêmes pour les deux populations de rats ³⁴⁶. Par ailleurs, les poumons de souris axéniques portaient 2,5 fois plus de cellules naturelles tueuses (NK) ³⁴⁷ et moins de Lymphocytes Treg ³⁴⁸. En outre, le microbiote augmente l'expression de gènes associés à l'immunité par la régulation à la hausse des niveaux d'IL-5, IL-10 et IFN γ ^{348,349}.

L'interleukine (IL)-1 α est exprimée de manière constitutive par les cellules épithéliales pulmonaires ainsi que par les macrophages alvéolaires, et est considérée comme une cytokine « de première ligne » dans la défense des poumons contre les pathogènes bactériens. Stimulée par l'exposition microbienne, l'IL-1 α intervient dans le recrutement des neutrophiles et l'activation de la réponse immunitaire innée ³⁵⁰. Chez la souris, la composition bactérienne pulmonaire est en corrélation avec l'abondance de l'IL-1 α et de l'IL-4 ³⁵¹. Il existe une relation entre les concentrations pulmonaires basales d'IL-4 et l'abondance relative de la famille des *Erysipelotrichaceae*. Cette dernière représentait 5 % des bactéries pulmonaires chez les souris présentant de faibles concentrations pulmonaires d'IL-4 et serait absente chez les souris présentant des concentrations pulmonaires d'IL-4 élevées ³⁵¹.

II.5.4. Rôle dans l'éducation du système immunitaire

Le développement du système immunitaire débute dès la 3^{ème} semaine de gestation dans le sac vitellin des embryons humains et se poursuit après la naissance ³⁵². La mise en place du microbiote pulmonaire joue un rôle clé dans ce processus. Dans un modèle murin d'asthme allergique, le rôle de Bacteroidetes dans la tolérance immunitaire pulmonaire a été décrit ³⁵³. En effet, dès les deux premières semaines après la naissance, la charge bactérienne dans les poumons est augmentée et le microbiote pulmonaire des souris nouveau-nés initialement riche en *Gammaproteobacteria* et en Firmicutes s'enrichit en Bacteroidetes. Les modifications du microbiote ont été associées à une diminution de la réactivité aux aéroallergènes et à l'émergence d'un sous-ensemble de cellules Treg dont le développement nécessite une interaction avec le ligand 1 de la mort programmée (PD-L1). Cependant, l'absence de colonisation microbienne ou le blocage de PD-L1 au cours des 2 premières semaines de vie a maintenu une réactivité exagérée aux allergènes jusqu'à l'âge adulte. Le rôle du microbiote pulmonaire dans l'éducation du système immunitaire a été également montré dans le développement de l'asthme. Cette étude montre que les enfants les plus exposés à des allergènes

et à des bactéries spécifiques au cours de leur première année étaient les moins susceptibles d'avoir une respiration sifflante récurrente et une sensibilisation allergique ³⁵⁴.

II.6. Les acides gras à chaîne courte (AGCC)

Les AGCC constituent un groupe de molécules qui peuvent compter jusqu'à sept atomes de carbone et qui existent sous forme de composés à chaîne droite ou ramifiée. Ils proviennent principalement de la fermentation bactérienne intestinale de matières végétales telles que les celluloses, les fibres, les amidons et les sucres ³⁵⁵. En effet, les fibres alimentaires qui échappent à la digestion sont métabolisées par le microbiote intestinal en AGCC qui peuvent atténuer les voies inflammatoires dans les macrophages et les cellules dendritiques, favoriser le développement de cellules T régulatrices (T reg) et assurer le maintien de l'intégrité et de la santé épithéliale intestinale ³⁵⁶.

Les AGCC agissent via deux mécanismes principaux : la signalisation via les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) "détectant les métabolites" ainsi que l'inhibition des histones désacétylases (HDAC) et les effets qui en résultent sur la transcription des gènes ³⁵⁷. Ils peuvent activer des voies de signalisation via au moins trois GPCR différents, à savoir GPR41 (récepteur 3 des acides gras libres ; FFAR3), GPR43 (récepteur 2 des acides gras libres ; FFAR2) et GPR109A (récepteur 2 des acides hydroxycarboxyliques ; HCAR2) ^{358,359}.

Les acides acétique, propionique et butyrique sont les principaux produits finaux de la fermentation microbienne intestinale et sont impliqués dans la régulation du système immunitaire intestinal. Ils interagissent avec le métabolisme tissulaire et régulent les voies métaboliques. Dans les conditions physiologiques, les taux d'AGCC dans le sang périphérique sont très faibles (de l'ordre du μM à un faible mM) en raison du métabolisme hépatique, l'acétate étant le principal AGCC en circulation ³⁶⁰. Les niveaux des AGCC peuvent être augmentés par l'adoption d'un régime riche en fibre ou par l'administration du butyrate ou du propionate ³⁶¹.

II.6.1. Les récepteurs spécifiques des acides gras à chaîne courte

Environ 800 récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) ont été décrits dans le génome humain. Un groupe de quatre GPCR (GPCR40, GPCR41, GPCR42 et GPCR43) a été identifié à proximité du gène CD22 sur le chromosome 19. Ils sont également appelés récepteurs d'acides gras libres (FFAR) car ils détectent les acides gras libres ³⁶². GPCR41 et GPCR43 sont des membres apparentés (52 % de similarité ; 43 % d'identité) d'une famille homologue de récepteurs orphelins couplés aux protéines G qui sont codés en tandem à un seul locus

chromosomique chez l'homme et la souris. GPR42 serait une duplication du gène GPR41 avec une différence de six acides aminés et pouvant être considéré comme un pseudogène. ³⁶³. GPR40 est le seul de ces quatre à être activé par des acides gras à chaînes plus longues et son expression est spécifique au cerveau et au pancréas. Les acides gras à chaîne courte sont donc inactifs dans les cellules exprimant GPR40 ³⁶⁴.

L'activation et le changement de conformation du récepteur, suite à la fixation des AGCC, favorise le couplage du récepteur à la protéine G. Cela pourrait activer en aval divers effecteurs membranaires ou cytosoliques tels que l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase C (PLC) ou les ras-MAP kinases (ras-MAPK). Les GPR41 et 109A sont couplés uniquement à la sous-unité G α i/o, tandis que GPR43 est couplé à la fois à la sous-unité G α i/o et G α q. Une activation des récepteurs couplés à G α i/o par les AGCC entraînerait l'inhibition de la voie de l'adénylate cyclase, alors que ceux couplés à G α q entraîneraient l'activation de la voie phospholipase C (PLC) et une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Les trois classes de GPR (41/43/109a) auront le même effet sur la signalisation passant par l'AC alors que GPR43 est le seul à moduler la signalisation médiée par la PLC ³⁶². Ainsi, le type de récepteur et de protéine G associée vont conditionner la traduction du signal et la réponse cellulaire. Les métabolites comme les acides gras à chaîne courte (AGCC) connus pour être produits par les bactéries intestinales pourraient pénétrer dans le poumon par la circulation, où ils sont impliqués dans la régulation immunitaire et jouent un rôle dans l'inflammation périvasculaire et le remodelage vasculaire pulmonaire (Figure 16) ³³⁵, mais aucune donnée n'est disponible à ce jour indiquant la possibilité d'une production et/ou accumulation locale pulmonaire d'AGCC.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur les effets du butyrate dans le développement de l'HTAP *in vitro* sur les cellules vasculaires pulmonaires et *in vivo* dans le modèle monocrotaline d'hypertension pulmonaire chez le rat.

II.6.2. Le butyrate

Le butyrate, un AGCC de quatre atomes de carbone est produit essentiellement par des bactéries à partir de fibres alimentaires. Il est produit à partir d'hydrates de carbone par glycolyse en combinant deux molécules d'acétyl-CoA pour former de l'acétoacétyl-CoA, réaction suivie d'une réduction en butyryl-CoA. Deux voies différentes sont connues pour l'étape finale de la formation du butyrate à partir de butyryl-CoA, qui passent soit par l'acétate CoA-transférase, soit par la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase (Figure 17) ³⁶⁵. La majeure partie du

butyrate produit au niveau du colon est utilisée comme principale source d'énergie pour les colonocytes ³⁶⁶.

Les espèces productrices de butyrate sont des membres des deux familles prédominantes de Firmicutes à Gram positif, les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae*, ainsi que d'autres familles de Firmicutes, notamment les *Erysipelotrichaceae* et les *Clostridiaceae* ³⁶⁷. Les concentrations plasmatiques de butyrate sont d'environ 0,5 à 14,2 $\mu\text{mol/l}$ ³⁶⁸.

Le sodium butyrate est un composé de formule $\text{Na}(\text{C}_3\text{H}_7\text{COO})$ qui est régulièrement utilisé dans les études *in vitro* et *in vivo*. Des études ont mentionné que le butyrate agit comme un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC) qui ont des effets anticancéreux capables de bloquer la prolifération cellulaire et favoriser la différenciation cellulaire ou l'apoptose ³⁶⁹. Sa capacité à inhiber l'inflammation, la prolifération et la migration ainsi que son impact dans l'induction de l'apoptose ont été décrits dans plusieurs études ³⁷⁰. Compte tenu de ces mécanismes d'action, le butyrate pourrait avoir un effet bénéfique dans des maladies mettant en jeu la prolifération cellulaire incontrôlée, une composante inflammatoire, la résistance à l'apoptose telles que l'HTAP¹⁸⁶.

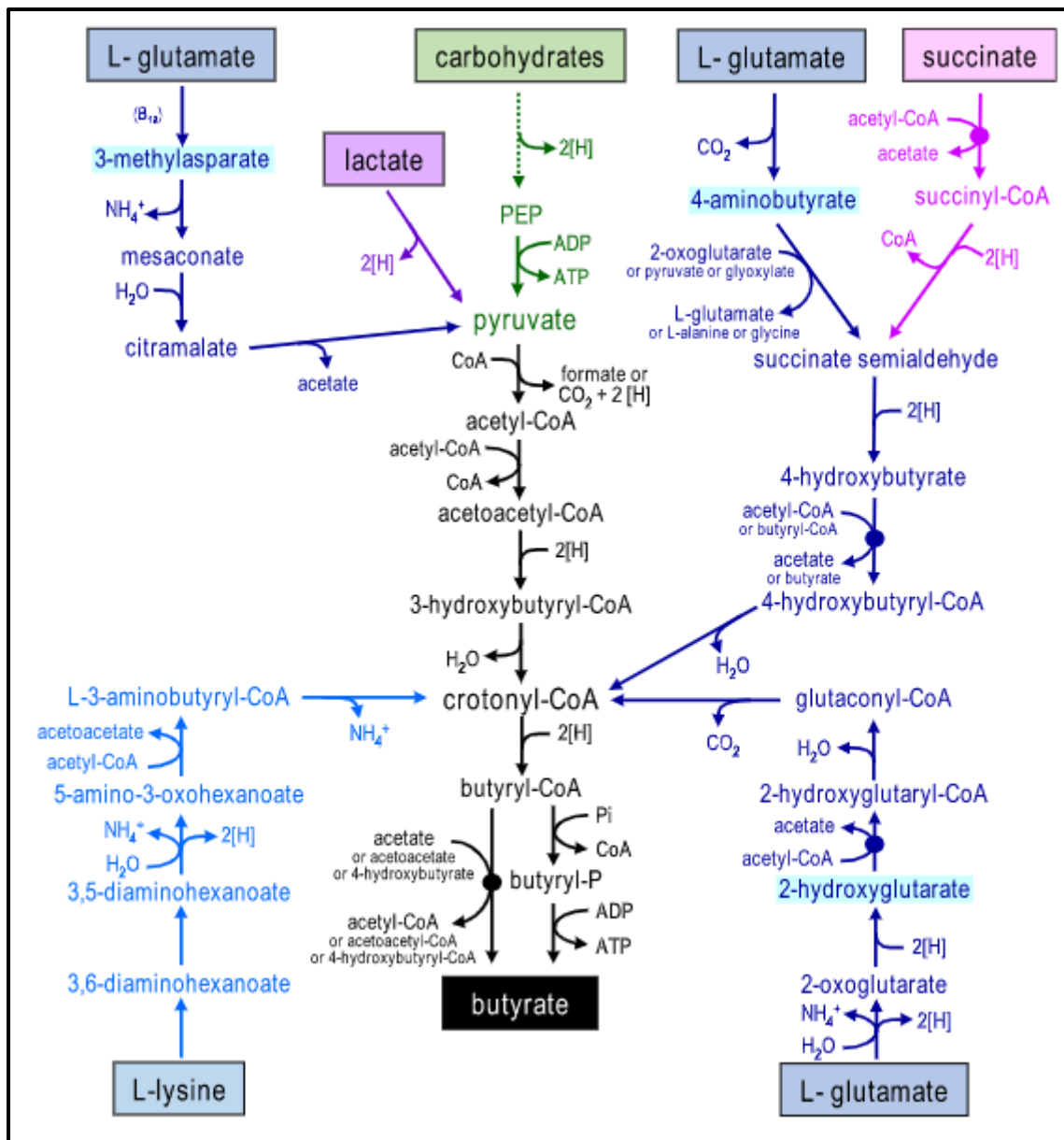


Figure 18 : Voies microbiennes pour la formation du butyrate à partir de glucides, d'acides organiques, de glutamate et de lysine dans les communautés intestinales. La fermentation des glucides en pyruvate via la glycolyse est représentée en vert, la formation de butyrate à partir de l'acétyl-CoA en noir, les voies de fermentation des acides aminés en bleu et la fermentation du lactate et du succinate en violet et rose, respectivement.

(Lous et Flint. 2016) ³⁷¹

II.6.2.1. Impact du butyrate dans la prolifération et la survie cellulaire

Le butyrate est un inhibiteur des HDAC qui peut stimuler la croissance des colonocytes normaux en fonctionnant comme une source d'énergie oxydative, ou peut inhiber la croissance des colonocytes cancéreux car il est métabolisé de manière inefficace en raison de l'effet Warburg, il s'accumule dans le noyau et fonctionne comme un inhibiteur d'HDAC pour réguler à la hausse l'expression des gènes impliqués dans l'inhibition de la prolifération. Cet effet différentiel est connu sous le nom de « paradoxe du butyrate »³⁷². En somme, l'effet Warburg influence les mécanismes énergétiques et épigénétiques qui régulent la prolifération cellulaire et l'acétylation des histones. Le butyrate inhibe la prolifération cellulaire et à l'inverse stimule l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro*. A travers sa capacité d'induction de la phosphorylation de p38 et l'inhibition de ERK1/2 et JNK dans les cellules leucémiques humaines K562, il entraîne la différenciation érythroïde. Ces effets du butyrate qui seraient médiés, en partie, par GPR41 et GPR43 sont bloqués par un inhibiteur de la MAPK p38 indiquant que le butyrate peut empêcher l'apoptose induite par le stress³⁷³.

GPR109A ou HCA2 reconnaît également le butyrate comme ligand et le complexe ainsi formé inhibe la progression du cancer du côlon chez des souris. En effet, le butyrate en se liant au GPR109A induit l'apoptose par la régulation à la baisse de Bcl-2, Bcl-xL et de la cycline D1, et la régulation à la hausse de la voie des récepteurs de la mort³⁵⁹.

Les AGCC comme le butyrate augmentent l'activité de l'AMPK dans les tissus hépatiques et musculaires³⁷⁴. L'activation de l'AMPK déclenche l'expression du coactivateur gamma du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PGC)-1 α , qui est connu pour contrôler l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription tels que le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) α , PPAR δ , PPAR γ , le récepteur X du foie (LXR) et le récepteur farnésioïde X (FXR), tous importants dans la régulation du métabolisme du cholestérol, des lipides et du glucose³⁷⁵. Dans une étude réalisée sur les CML-AP, le butyrate de sodium a inhibé la prolifération et la migration induites par le PDGF par inhibition de la phosphorylation de Akt et une augmentation importante de Akt acétylé, entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire³⁷⁶.

Le sodium butyrate inhibe la croissance et la migration cellulaire et induit l'apoptose dépendante de la caspase dans les cellules cancéreuses de la vessie humaine via l'axe miR-139-5p/Bmi-1³⁷⁷. Il pourrait également sensibiliser les cellules cancéreuses de la vessie aux médicaments anticancéreux *in vitro*³⁷⁸.

Le butyrate pourrait diminuer l'expression de la neuropiline 1 (NRP1) en supprimant la transactivation de Sp1 pour inhiber l'angiogenèse, les métastases et la survie des cellules

cancéreuses colorectales ³⁷⁹. Il régule positivement miR-3935, qui à son tour inhibe la croissance et la migration des cellules dans le cancer du poumon ³⁸⁰. Enfin, il pourrait aussi inhiber la croissance des cancers du poumon et de la prostate en augmentant l'expression de p21, en activant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire par réduction de l'expression de la survivine ³⁸¹.

II.6.2.2. Impact du butyrate dans les processus inflammatoires

L'afflux de cellules inflammatoires identifiées dans l'HTAP contribue au remodelage vasculaire pulmonaire. Le butyrate exerce également ses effets anti-inflammatoires en inhibant le développement des cellules T helper 17 (Th17) et en régulant à la baisse les chimiokines VCAM-1 et CX3C Fractalkine dans les cellules endothéliales ³⁸². L'administration de butyrate peut inverser l'augmentation de macrophages CD68+ et CD163+ dans les poumons de rats présentant une HTP induite par l'hypoxie ³⁸². Une étude récente a démontré que le butyrate favorise la production d'IL-22 dans les cellules T CD4⁺ et les cellules lymphoïdes innées, conduisant à la protection de l'intestin contre les dommages inflammatoires ³⁸³. L'IL-22 est essentielle à la protection de l'hôte contre les agressions inflammatoires en induisant des peptides antimicrobiens et en favorisant la fonction de barrière épithéliale ³⁸⁴.

Dans les maladies intestinales inflammatoires, le sodium butyrate améliore significativement la réponse inflammatoire et le dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale chez les souris. *In vitro*, le prétraitement avec le SB a considérablement inhibé l'expression du TNF- α et de l'IL-6 dans les macrophages RAW246.7 exposés au LPS. Il inhibe ainsi la phosphorylation de NF- κ B p65 et AKT induite par le LPS, mais pas celle de la MAPK ³⁸⁵. Par l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B ainsi que par sa capacité à induire la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le butyrate va inhiber l'inflammation ³⁸⁶. Les mastocytes jouent un rôle central dans la médiation de l'inflammation en libérant divers médiateurs. Le butyrate empêche la production de cytokines mastocytaires en inhibant les histones désacétylases et l'initiation de la transcription ³⁸⁷.

II.7. Microbiote pulmonaire et pathologies respiratoires

Les techniques de séquençage à haut-débit ciblant essentiellement l'ADN ribosomique 16S des bactéries ont permis d'avoir une vue plus élargie de la signature génétique du microbiote dans les voies respiratoires et de son rôle dans certaines pathologies. De nombreuses études ont montré que le microbiote des voies respiratoires joue un rôle crucial dans le développement, la progression et l'exacerbation des maladies pulmonaires ^{388,389}. Des études montrent désormais

qu'un changement dans la composition du microbiote et la dysbiose sont associés à l'exacerbation de certaines maladies. Des études rapportent que le microbiote de l'hôte joue un rôle important dans la résistance aux pathogènes pulmonaires. Comme le montrent plusieurs modèles murins, les souris axéniques sans germes, dépourvues de toutes bactéries, sont plus susceptibles de développer des infections pulmonaires bactériennes et virales aiguës comparées aux souris contrôles³⁹⁰. Cependant, peu d'informations existent sur les mécanismes par lesquels ce microbiote régule le développement et la progression de ces maladies. Le microbiote respiratoire est impliqué dans des mécanismes clés de nombreuses pathologies pulmonaires (Figure 18).

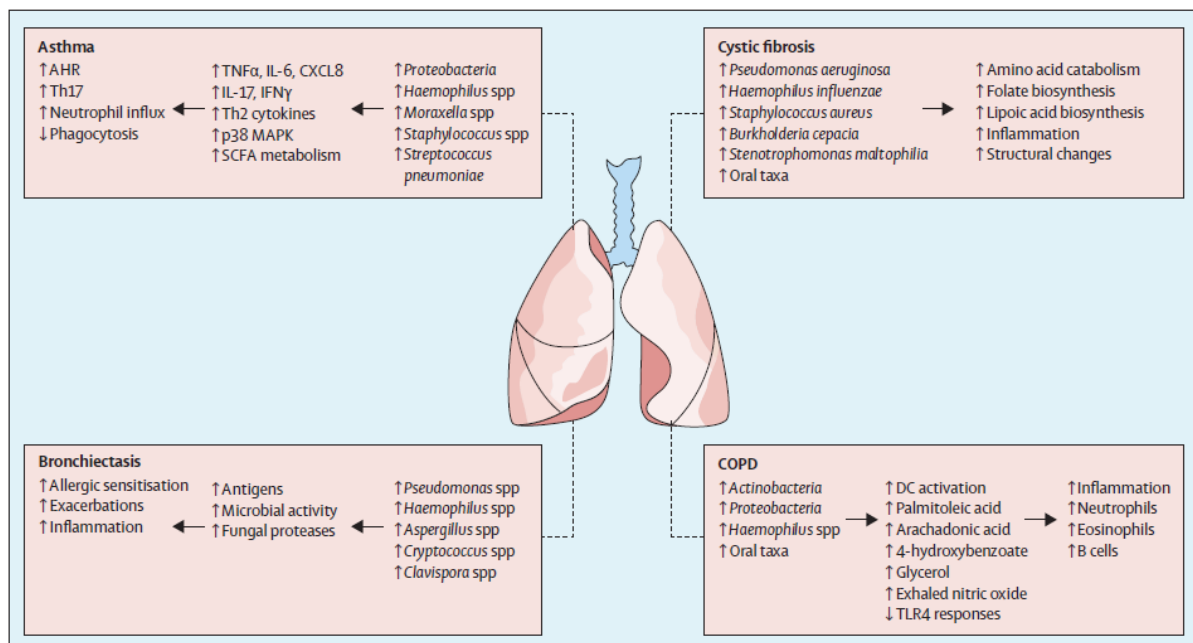


Figure 19 : Rôles des microbiomes respiratoires dans les maladies respiratoires chroniques (Budden KF et al, 2019)³⁸⁸

II.7.1. Microbiote pulmonaire et Asthme

L'asthme est une maladie chronique qui touche environ 4 millions de personnes en France et 340 millions dans le monde. C'est une maladie très fréquente chez les enfants. Elle est caractérisée par un rétrécissement des voies aériennes, dû à l'inflammation et la contraction des muscles lisses qui les entourent. Des communautés microbiennes des voies respiratoires sont significativement associées au degré d'hyperréactivité bronchique chez les patients atteints d'asthme^{391,392}. En effet, le microbiote des patients atteints d'asthme serait différent de celui des patients sains. Selon certaines études, une diminution de la charge microbienne et une augmentation de la diversité des bactéries du phylum *Proteobacteria* et de bactéries

potentiellement pathogènes composées des genres *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria* ou *Streptococcus* sont observés dans l'asthme. Cela peut s'accompagner d'une diminution des bactéries du phylum Bacteroidetes et du genre *Prevotella*, des bactéries potentiellement protectrices par inhibition de la croissance d'autres bactéries ³⁹³. Les protéobactéries sont les plus répandues chez les patients asthmatiques. Leur augmentation est associée à une hyper-réactivité ³⁹² et à une inflammation induite par Th17 et IL-17, et favorise le recrutement de neutrophiles via IL-17A/F ³⁹¹. Le séquençage de l'ARNr 16S du microbiote bronchique a révélé des niveaux plus élevés d'*Haemophilus*, de *Neisseria*, de *Fusobacterium*, de *Porphyromonas* et de *Sphingomonadaceae*, et de faibles niveaux de bactéries de type *Mogibacterium* et *Lactobacillales* chez les patients souffrant d'asthme atopique. Cette augmentation relative des *Proteobacteriae* est due aux espèces *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria* ³⁹³. Une augmentation de l'abondance d'espèces de *Lactobacillus* durant une infection par le virus respiratoire syncytial dans la petite enfance est associée à une réduction du risque de sifflements à l'âge de 2 ans ³⁹⁴. Les enfants allaités ou qui ont peu d'infections respiratoires dans les deux premières années de vie ont en revanche une colonisation plus précoce des voies aériennes supérieures par les Staphylocoques, ce qui pourrait être un facteur de protection éventuel vis-à-vis de l'asthme ³⁹⁵. Ces bactéries pulmonaires retrouvées chez les patients asthmatiques ont une implication dans le métabolisme du butyrate et du propionate, ce qui pourrait limiter la biodisponibilité des AGCC et conduire à l'asthme atopique ³⁹⁶. Une alimentation riche en fibres supprime les maladies allergiques des voies respiratoires en améliorant les cellules T régulatrices (Treg) par l'inhibition de HDAC9 ³⁹⁷. Ces bactéries pathogènes spécifiques auraient la capacité, en colonisant les voies respiratoires des patients asthmatiques, d'influencer la réponse des cellules immunitaires à la pharmacothérapie, tels que les corticostéroïdes.

II.7.2. Microbiote pulmonaire et Mucoviscidose

La mucoviscidose est une pathologie génétique autosomique récessive due à des mutations du gène CFTR (régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique). Ces mutations modifient la régulation du transport des ions chlorure et de l'eau à travers les cellules épithéliales et ont pour conséquence majeure le développement d'un mucus hyper-visqueux qui, associé à une altération de la réponse immunitaire, fragilise le microbiote pulmonaire endogène au profit d'agents pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou le complexe *Burkholderia cepacia* ³⁹⁸. C'est pourquoi la mucoviscidose est considérée comme

une infection polymicrobienne³⁹⁹. Des observations chez des enfants montrent que la colonisation se fait très précocement, avant l'âge de 1 an, par le genre *Pseudomonas* qui est l'un des 10 taxons majoritaires en termes d'abondance relative dans le LBA chez les nourrissons cliniquement atteints de mucoviscidose^{400,401}. La prévalence de la mucoviscidose peut atteindre 60 % entre 13 et 17 ans puis diminue avec l'âge^{402,403}. Après 45 ans, une nouvelle augmentation de plusieurs genres anaérobies, dont *Veillonella*, *Haemophilus* et *Porphyromonas*, est observée⁴⁰². *Pseudomonas aeruginosa* a été identifié comme principale entité pathogène du microbiote pulmonaire dans la mucoviscidose⁴⁰⁴.

II.7.3. Microbiote pulmonaire et bronchopneumopathie chronique obstructive

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie à composante inflammatoire très importante avec une obstruction irréversible des voies respiratoires. C'est la quatrième cause de décès dans le monde⁴⁰⁵. Deux facteurs sont à l'origine de cette maladie : la réduction du calibre des bronchioles et la destruction des alvéoles pulmonaires. Cette pathologie est essentiellement liée à l'exposition au tabac qui a des effets délétères sur le tractus respiratoire (altération du système muco-ciliaire, inflammation, fibrose, etc). Cependant, bien que le tabac en soit la cause principale, elle pourrait aussi être due à des infections chroniques ou récurrentes des voies aériennes inférieures⁴⁰⁶. Il a été montré que l'exposition au tabac pouvait modifier la composition des microbiotes respiratoires. Comme au cours de la mucoviscidose, il existe, dans cette pathologie, une implication du microbiote pulmonaire. Un essai démontrant le bénéfice de l'azithromycine chronique chez les patients présentant des exacerbations fréquentes de la BPCO a suscité un regain d'intérêt au carrefour du microbiote pulmonaire/des voies respiratoires, de l'inflammation et du développement d'une obstruction irréversible des voies respiratoires⁴⁰⁷. Des analyses effectuées sur le microbiote dans les tissus pulmonaires, le LBA et les crachats ont montré que les plus grandes différences de flore entre les patients atteints de BPCO et les témoins sains étaient observées chez *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* et *Haemophilus*, dont les abondances relatives étaient significativement élevées et corrélée positivement avec l'aggravation de la maladie^{408,409}. Une autre étude a montré que les principaux phyla composant les microbiotes de ces patients sont Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, et Firmicutes et les principaux genres sont *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria*⁴⁰⁶. Le microbiote respiratoire de ces patients montrait une augmentation de l'abondance relative des Proteobacteria et une diminution de l'abondance relative des Bacteroidetes avec une proportion significativement plus importante de bactéries

du genre *Haemophilus*³⁹³, un des principaux micro-organismes impliqués dans les exacerbations chez les patients atteints de BPCO .

II.8. Impact du microbiote pulmonaire sur le développement de l'HTAP

Le système respiratoire humain comprend les voies respiratoires supérieures (le nez, le pharynx et le larynx) et les voies respiratoires inférieures (la trachée, les bronches supérieures et inférieures des poumons). La présence de microbiote dans les voies respiratoires inférieures, dont la composition différait entre les patients souffrant de BPCO et d'asthme a été décrite³⁹³. Après cette preuve de l'existence de bactéries dans les voies respiratoires inférieures, de nombreuses études, pour la plupart, orientées sur le microbiote intestinal et les voies aériennes supérieures (Tableau 4) ont été réalisées pour rechercher des dysbioses bactériennes dans les maladies respiratoires. En raison de la difficulté d'accès au microbiote pulmonaire résident, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur le microbiote des voies respiratoires inférieures dans l'HTAP et seules quelques études ont comparé la composition de l'écosystème microbien des voies respiratoires supérieures chez des témoins et des patients HTAP.

Les résultats ont révélé que des changements fonctionnels du microbiome intestinal telle qu'une augmentation des bactéries productrices de TMA/TMAO pourraient influencer le développement de l'HTAP et augmenter le risque de survenue des maladies cardiovasculaires. En effet, les taxons producteurs de TMA/TMAO (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Citrobacter*, *Collinsella*) étaient significativement élevés dans le microbiome des patients HTAP⁴¹⁰. Ainsi, l'augmentation de *Collinsella* chez les patients HTAP peut contribuer à la pathogénèse de la maladie en augmentant la perméabilité intestinale par la régulation à la baisse les protéines des jonctions serrées et en favorisant la production d'IL-17A épithéliale^{411,412}.

Les phyla dominants des voies respiratoires supérieures, tels que Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, *Fusobacteria* et *Saccharibacteria*, chevauchent partiellement avec ceux du microbiote intestinal⁴¹². Une étude comparée des régions V3-V4 du microbiote des voies respiratoires (échantillons d'écouvillonnage pharyngé) de patients atteints d'HTP (HTAP du groupe 1 et HTP des groupes 3 et 4) et de sujets sains a révélé une perte de diversité communautaire et une dysbiose bactérienne mesurée par le rapport Firmicutes / Bacteroidetes chez les patients HTP, montrant que le microbiote pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse de l'HTP⁴¹². Il est intéressant de souligner que dans cette étude les mêmes perturbations du microbiote pharyngé ont été observé chez des patients appartenant à différents sous-groupes d'HTAP et d'HTAP. Il a été également rapporté dans cette étude que la proportion

de *Streptococcus* dans le microbiote intestinal était élevée à la fois chez les patients atteints d'HTP et chez les modèles animaux d'HTP. Dans le microbiote des voies respiratoires, *Streptococcus* a été significativement associé aux HTP ⁴¹².

La thrombospondine 1 (THBS1) favorise la vasoconstriction pulmonaire induite par l'hypoxie en activant la voie de signalisation du TGF- β ⁴¹³. Or dans l'HTAP, il existe un déséquilibre des voies TGF β / BMPRII en faveur du TGF β . Une étude de suivi de la composition en microbiote du LBA en post-transplantation pulmonaire a révélé que des bactéries du microbiote des voies respiratoires telles que *Streptococcus* et *Prevotella* étaient associées à une expression élevée de la thrombospondine 1 qui régule un ensemble de gènes caractéristiques de la production de matrice extracellulaire tels que les métalloprotéinases (MMP7, MMP9 et MMP12) ⁴¹⁴, suggérant que l'interaction entre l'hôte et les microbes détermine potentiellement les activités de remodelage dans le poumon transplanté

Des études chez des volontaires sains ont révélé que l'enrichissement en *Veillonella* et *Prevotella* dans le microbiote pulmonaire évalué à partir du LBA était corrélé positivement avec des niveaux élevés de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1 α , IL-1 β , IL-6, fractalkine et IL-17 ⁴¹⁵. Cela était principalement observé chez la moitié des individus sains, enrichis en taxons oraux, indiquant que le microbiote dérivé de l'aspiration joue un rôle dans la régulation de l'état inflammatoire basal de la muqueuse pulmonaire.

Dans une étude pilote du microbiome intestinal (échantillons fécaux) chez 20 sujets atteints d'HTAP et 20 sujets témoins sains, publiée en 2022, les auteurs n'ont trouvé aucune association entre la gravité de la maladie (PVR la plus proximale, PAPm et distance de marche de six minutes) et les mesures globales de l'abondance microbienne (diversité alpha, rapport F/B). Les auteurs pensent cependant que la taille limitée de leur échantillon, l'absence d'autres mesures reflétant la gravité de l'HTAP et le fait de n'avoir mesuré que la diversité globale (comparable entre les patients HTAP et non HTAP) constituent des limites de leur étude ⁴¹⁶.

Type d'échantillon	Phyla et (<i>genres enrichi</i>)	Phyla et (<i>genres diminués</i>)	Références
Humain Echantillons fécaux	Firmicutes (<i>Clostridium, Staphylococcus, Blautia, Streptococcus, Roseburia, Rumonococcus</i>), Bacteroidetes (<i>Prevotella</i>), Actinobacteria (<i>Rothia, Bifidobacterium, Collinsella, Coriobacteriales</i>), Proteobacteria (<i>Citrobacter, Desulfovibrio, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Pseudomonas</i>)	Firmicutes (<i>Coprococcus, Butyrivibrio, Clostridia, Lachnospiraceae, Eubacterium, Akkermansia, Lactococcus, Subdoligranulum</i>), Bacteroidetes Proteobacteria (<i>Parasutterella</i>)	Kim S. et al. (2020) ⁴¹⁰
Humain Échantillons d'écouvillons pharyngés	Firmicutes (<i>Streptococcaceae, Streptococcus</i>), Proteobacteria (<i>Lautropia, Ralstonia</i>), <i>Fusobactéries</i> (<i>Leptotrichiaceae, Leptotrichia</i>), <i>Chloroflexi</i>	Firmicutes (<i>Carnobacteriaceae, Granulicatella</i>), Bacteroidetes (<i>Prevotella, Porphyromonadaceae, Flavobacteriaceae, Alloprevotella, Capnocytophage</i>), Actinobacteria (<i>Rothia</i>), Proteobacteria (<i>Haemophilus, Saccharibacteria, SRI_Absconditabacteria</i>)	Zhang et al. (2020) ⁴¹²
Humain Échantillons fécaux	Firmicutes (<i>Anaerostipes rhamnosivorans</i>)	Firmicutes (<i>bactérie Lachnospiraceae GAM79, Amedibacterium intestinale, Ruminococcus bicirculans, Ruminococcus albus</i>)	José et al. (2022) ⁴¹⁶
Humain Echantillons D'écouvillons oropharyngés	Firmicutes Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria,	<i>Fusobactéria,</i> <i>Patescibacteria</i>	Wang et al. (2022) ⁴¹⁷

Tableau 4 : Etudes de microbiotes dans l'HTAP humaine

Le rôle du microbiote a également été étudié dans les modèles d'hypertension pulmonaire pour mieux comprendre comment les bactéries et leurs métabolites régulent le développement de la maladie. Cependant, le constat est que la majeure partie des études réalisées sont basées sur le microbiote intestinal (Tableau 5). Cela pourrait s'expliquer par plusieurs raisons, entre autres, la facilité d'échantillonnage et l'abondance de bactéries dans les échantillons fécaux. L'HTAP étant une maladie avec une signature pathologique pulmonaire, les études basées sur le microbiote intestinal donnent certes des indices intéressants, cependant, des études du microbiote pulmonaire seraient plus indiquées pour fournir des indices de l'impact de bactéries et/ou de métabolites bactériens au cours du développement de l'HTAP.

Dans une étude de microbiote intestinal réalisée sur des rats dans le modèle sugen-hypoxie (Su / Hx), les auteurs ont n' montré aucune différence de diversité α ou β chez les animaux malades comparés aux animaux témoins. Cependant, ils ont observé une augmentation du rapport F/B indiquant une dysbiose intestinale, caractérisée par un triplement de ce rapport chez les rats malades. Les bactéries productrices de butyrate et d'acétate étaient diminuées chez les rats malades ⁴¹⁸. Dans le même modèle d'HTP, Sanada et ses collaborateurs ont utilisé un cocktail d'antibiotiques contenant l'ampicilline, la vancomycine, la néomycine et le métronidazole pour modifier la composition du microbiote intestinal. Cette modification du microbiote intestinal a significativement atténué la progression du remodelage vasculaire induite par le sugen-hypoxie. Le rapport F/B était également élevé chez les rats Su / Hx ⁴¹⁹. Les proportions de Bacteroidetes, connus pour l'induction de cellules T régulatrices (Tregs) via la production de LPS ⁴²⁰ et d'*Akkermansia*, qui sont liées à la suppression de l'inflammation, ont diminué chez les rats Su/Hx. Ces diminutions pourraient être liées au développement de l'HTAP. L'augmentation de *Rothia* et *Prevotellaceae* chez les rats Su / Hx pourrait être associée à l'induction de l'inflammation. *Rothia dentocariosa*, couramment isolé de la cavité buccale est associé à la production de TNF- α et à l'inflammation chronique dans les maladies parodontales ⁴²¹.

Dans un autre modèle d'HTP modérée induite par l'hypoxie sur des rats Sprague-Dawley (SD), l'administration de butyrate prévient l'hypertrophie ventriculaire droite, l'augmentation de la pression systolique ventriculaire droite, le remodelage vasculaire pulmonaire et la perméabilité, induits par l'hypoxie. Le butyrate a également augmenté l'acétylation de l'histone H3, diminué l'accumulation de macrophages pulmonaires alvéolaires et interstitiels. Il a protégé les CE contre la rupture de la barrière induite par le TNF α et le LPS via la régulation positive des protéines de jonctions serrées (occludine, cinguline, claudin-1) ³⁸².

Dans le modèle MCT, le microbiome intestinal est altéré avec une diversité microbienne plus faible chez les rats malades. Cette altération du microbiote intestinal par la MCT induit une dérégulation de certaines voies métaboliques enrichies dans les voies de signalisation MAPK, de chimiokines, ou encore de PPAR. Firmicutes-*Clostridia* est augmenté dans le groupe MCT avec une abondance relative d'*Allobaculum*, *Ralstonia* et *Bifidobacterium* ⁴²².

Echantillon et modèle	Phyla et (<i>genres enrichi</i>)	Phyla et (<i>genres diminués</i>)	Références
Rat Echantillons fécaux Su5416 - Hypoxie	Firmicutes (<i>Peptostreptococcaceae</i>)	Firmicutes (<i>Butyrivibrio</i> , <i>Aerococcaceae</i> , <i>Syntrophomonadacea</i>), Bacteroidetes (<i>Odoribacter</i> , <i>Butyricimonas</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Parabacteroides</i>), Proteobacteria (<i>Pasteurellaceae</i>)	Callejo et al. (2018) ⁴¹⁸
Rat Echantillons fécaux Su5416 - Hypoxie	Firmicutes (<i>Coprococcus</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Allobaculum</i> , <i>Coprostanoligenes</i> , <i>Acetitomaculum</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Faecalibaculum</i>), Bacteroidetes (<i>Prevotellaceae</i> , <i>Parabacteroides</i>), Actinobacteria (<i>Rothia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Parvibacter</i>), Proteobacteria (<i>Parasutterella</i>), <i>Cyanobactéries</i>	Firmicutes (<i>Dehalobacterium</i> , <i>Akkermansia</i> , <i>Marvinbryantia</i> , <i>Enterococcus</i>), Bacteroidetes	Sanada et al. (2020) ⁴¹⁹
Rat Echantillons fécaux MCT et ANG-II	Firmicutes (<i>Clostridiales</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Aerococcaceae</i> , <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Oscillospira</i>), Actinobacteria (<i>Corynebacteriaceae</i> ,	Firmicutes (<i>Streptococcaceae</i> , <i>Blautia</i>), Bacteroidetes (<i>S24_7</i> , <i>Bacteroidia</i>), Actinobacteria (<i>Bifidobacterium</i>), Proteobacteria (<i>Enterobacteriales</i> ,	Sharma et al. (2020) ⁴²³

	<i>Corynebacterium</i>), <i>Ténéricutes (Mollicutes)</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Proteus</i>)	
Rat Echantillons fécaux MCT	Firmicutes (<i>Clostridia</i> , <i>Allobaculum</i> , <i>Turicibacter</i> , <i>Clostridium</i>), Actinobacteria (<i>Bifidobacterium</i>), Protéobacteria (<i>Ralstonia</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>), <i>Candidatus_Saccharimonas</i>	Firmicutes (<i>Romboutsia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacilli</i>), Bacteroidetes (Bacteroidota), <i>Spirochaetota</i>	Hong et al. (2021) ⁴²²
Souris Echantillons fécaux Hypoxie	Firmicutes (<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Christensenella</i> , <i>Erysipelotrichaceae</i>), Bacteroidetes (<i>Marinifilaceae</i> , <i>Rikenellaceae</i>), Actinobacteria (<i>Gordonibacter</i> , <i>Coriobacteriales</i> , <i>Eggerthellaceae</i>), Proteobacteria (<i>Oceanospirillales</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Rhodospirillales</i>), <i>Melainabacteria</i>	Firmicutes (<i>Lachnospiraceae</i>), Bacteroidetes (<i>Bacteroidaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Tannerellaceae</i>), Proteobacteria	Luo et al. (2021) ⁴²⁴

Tableau 5 : Etudes de microbiote dans les modèles animaux d’HTP

II.9. Thérapies probiotiques et prébiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, alors que les prébiotiques sont des glucides non digestibles qui sont métabolisés par les bactéries intestinales et stimulent la croissance et l'activité de bactéries bénéfiques ⁴²⁵. La majorité de ces traitements ont été utilisés au niveau du microbiote intestinal même si ces derniers ciblaient des pathologies respiratoires. Les probiotiques et les prébiotiques modifient l'équilibre du microbiote et interagissent avec l'immunité innée et adaptative pour favoriser la libération de métabolites anti-inflammatoires et de produits sécrétés qui pourraient avoir des effets bénéfiques sur la santé ⁴²⁶. Les traitements antibiotiques fréquents changent considérablement la composition et la diversité du microbiote ^{427,428}, avec des conséquences potentielles sur la santé.

II.9.1. Thérapies probiotiques

Les probiotiques peuvent réduire les exacerbations inflammatoires pulmonaires et intestinales en restaurant des microbiomes intestinaux bénéfiques, notamment quand ces derniers ont été modifiés par des traitements antibiotiques. Ils améliorent la motilité et la fonction de barrière au niveau intestinal, inhibent les bactéries pathogènes et contribuent à l'amélioration de la réponse immunitaire intestinale et pulmonaire ⁴²⁹.

Des études à petite échelle ont montré que *Lactobacillus gasseri* entraîne une amélioration des symptômes de l'asthme et de la rhinite allergique ⁴³⁰. Des essais cliniques randomisés utilisant des souches uniques de probiotiques *Lactobacilles* et *Bifidobactéries* n'ont eu aucun effet sur la prévention de l'asthme allergique ⁴³¹, alors que *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* ont amélioré la fonction pulmonaire et réduit les exacerbations chez des enfants atteints d'asthme atopique léger et modéré ⁴³². L'administration du probiotique *Streptococcus salivarius* aux adultes atteints de pharyngite streptococcique orale récurrente a réduit de manière significative (d'environ 80 %) les cas d'infections pharyngées induites par *S pyogenes* par rapport aux patients non traités. Un essai clinique a montré qu'une supplémentation en *Lactobacillus plantarum* 299v réduisait les troubles endothéliaux vasculaires et les biomarqueurs de l'inflammation systémique chez les patients de sexe masculin atteints de maladie coronarienne stable ⁴³³. Wedgwood et ses collaborateurs ont rapporté que le retard de croissance post-natale chez les enfants prématurés induit une dysbiose intestinale et qu'un traitement probiotique avec *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 était capable d'inverser l'HTAP induite par ce retard de croissance postnatale ⁴³⁴. Les auteurs ont conclu que des changements dans le microbiote intestinal peut impacter le développement vasculaire pulmonaire, cependant ce travail n'apporte pas d'information sur le microbiote pulmonaire per se.

L'administration directe de probiotiques dans les voies respiratoires reste inexplorée. De même que la plupart des bactéries commensales utilisées comme probiotiques proviennent du tractus gastro-intestinal, des bactéries commensales du système respiratoire ont également été signalées comme potentielles probiotiques. Il a été montré que l'inoculation intranasale de bactéries pulmonaires a influencé le développement de l'asthme allergique : la souche CNCM I 4970 exacerbe certaines caractéristiques de l'asthme tandis que la souche pro-Th1 CNCM I 4969 (souche brevetée) isolée des poumons de souris néonatales a des effets protecteurs ⁴³⁵. Une autre étude a démontré que l'administration intranasale d'*E coli* ou de souches d'*Acinetobacter lwoffii* et de *Lactococcus lactis*, des souches bactériennes provenant de l'environnement des fermes, réduisent l'inflammation et la réaction allergique chez la souris

⁴³⁶, suggérant que l'environnement des fermes pourrait protéger contre l'allergie. *Clostridium butyricum*, un probiotique producteur de butyrate, inhibe le développement des tumeurs intestinales en modulant la signalisation Wnt et le microbiote intestinal en favorisant une augmentation des taux des AGCC et l'activation de GPR spécifiques ⁴³⁷.

II.9.2. Thérapies prébiotiques

Une autre stratégie de régulation du microbiote intestinal est la thérapie prébiotique. Il est connu que les oligosaccharides d'algues pouvaient exercer des effets anti-inflammatoires et antioxydants en tant que prébiotiques et améliorer l'HTP induite par la MCT chez les rats ⁴³⁸. De plus, les polysaccharides d'algues tels que le fucoïdane, la laminarine, l'alginate, l'ulvane et le porphyrane peuvent augmenter la production d'AGCC ^{438,439}. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) connus sous le nom de PUFA en anglais, ont été définis comme candidats prébiotiques par l'International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. La supplémentation maternelle en AGPI oméga-3 prévient l'HTP induite par l'hyperoxie chez la progéniture en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires, l'angiogenèse et le remodelage vasculaire chez les rats ⁴⁴⁰. Les effets bénéfiques des AGPI oméga-3 dans l'amélioration des lésions pulmonaires étaient également associés à une inhibition de l'infiltration leucocytaire et à une expression réduite des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α ⁴⁴⁰. L'administration orale de monoacylglycérade d'acide docosapentaénoïque supprime l'inflammation et le remodelage vasculaire et prévient la progression de l'HTP induite par la MCT chez le rat via une réduction de l'activation de NF- κ B, de p38 MAPK, et des niveaux d'expression de MMP-2, MMP-9 et VEGF ⁴⁴¹.

Ainsi, l'apport de probiotiques et de prébiotiques ou une combinaison des deux, c'est-à-dire des symbiotiques, peut aider à prévenir et à traiter l'HTAP. Cependant, en raison des grandes différences individuelles de composition microbienne chez l'homme, la standardisation de la dose et de la composition des produits prébiotiques est devenue un défi majeur qui doit être relevé dans des études plus vastes.

II.10. Ciblage des bactéries pathogènes

Il est également possible de cibler les principaux pathogènes bactériens pour réduire leur impact dans les pathologies respiratoires. Cela a déjà été réalisé dans certaines pathologies respiratoires. La vaccination contre les principaux pathogènes bactériens chez les patients souffrant d'asthme ou de BPCO pourrait entraîner une réduction de la charge en bactéries

pathogène et de l'inflammation associée à l'instar des vaccins ciblant IL-4 ou IL-13. En effet, l'infection chronique à *Haemophilus influenzae* favorise l'inflammation induite par les neutrophiles et les Th17 et les maladies allergiques des voies respiratoires insensibles aux stéroïdes ; par conséquent, la prévention de la colonisation bactérienne pourrait représenter une cible prometteuse pour les thérapies complémentaires dans l'asthme et la BPCO ⁴⁴².

La vaccination contre la grippe peut réduire les infections bactériennes secondaires à *Streptococcus pyogenes* ⁴⁴³. Les effets protecteurs des bactéries commensales pourraient également être exploités. *Haemophilus haemolyticus*, un commensal pulmonaire courant, produit une protéine de type bactériocine qui inhibe la croissance des *influenzae* pathogènes non typables ⁴⁴⁴.

L'étude du microbiote pulmonaire est possible, aujourd'hui, grâce à l'avancée des techniques de séquençage et les outils bio-informatiques disponibles pour l'analyse des données de séquençage. Le lien entre le microbiote pulmonaire et les maladies respiratoires est le défi auquel nous devons répondre. Depuis sa découverte, plusieurs questions telles que la composition du microbiote dans les pathologies pulmonaires et dans l'HTAP (qui varie considérablement d'un individu à l'autre en fonction des facteurs environnementaux), la grande diversité du microbiote pulmonaire et son rôle dans la santé de l'hôte ne sont pas clairement élucidées.

Ma thèse s'inscrit donc dans le contexte de la compréhension du rôle joué par le microbiote de manière générale et le microbiote pulmonaire en particulier dans les processus de mise en place du remodelage vasculaire pulmonaire et de développement de l'HTAP. En d'autres termes, nous voulons comprendre comment et par quels mécanismes le microbiote régule le remodelage et l'HTAP.

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Il a fallu du temps pour prouver la présence de bactéries dans le poumon humain sain. Ce dogme qui soutenait que le poumon est un organe stérile a été difficile à casser. Cependant, avec la découverte des techniques de séquençage à haut débit, les technologies utilisant l'ARNr 16S ont permis d'associer des profils de communautés microbiennes de l'écosystème bactérien à diverses pathologies, notamment des pathologies respiratoires telles que l'asthme, la mucoviscidose, la BPCO et récemment l'HTAP. La majorité des études portent sur le microbiote intestinal, beaucoup plus accessible que le microbiote pulmonaire. Il est donc difficile de prouver le rôle intrinsèque du microbiote pulmonaire dans les pathologies respiratoires, notamment l'HTAP. Des études ont montré un lien entre le microbiote intestinal et la régulation de certains mécanismes clés de l'HTAP. Aujourd'hui, le challenge est de montrer le rôle du microbiote nichant dans le poumon dans les différents processus qui favorisent le remodelage vasculaire pulmonaire et l'HTAP.

HYPOTHESE DE TRAVAIL

Vue la découverte récente du microbiote pulmonaire, très peu d'études ont été réalisées pour comprendre son rôle dans le développement de l'HTAP. La plupart des études ont été réalisées sur le microbiote intestinal qui reste de très loin le plus étudié, et la question du microbiote pulmonaire est essentiellement abordée par des études de prélèvements des voies aériennes supérieures. En somme, il n'existe pas d'étude ayant caractérisé la composition du microbiote du tissu pulmonaire dans l'HTAP et étudié le rôle potentiel que pourrait jouer ce microbiote dans l'initiation et/ou le développement de cette pathologie. Pour résumer, aucune étude n'a décrit, à ce jour, la composition du microbiote du parenchyme pulmonaire dans l'HTAP. De plus, les liens entre le remodelage vasculaire pulmonaire, mécanisme clé de la pathogénèse de l'HTAP, et les communautés bactériennes et/ou leurs métabolites ne sont pas encore élucidés.

Nous avons émis l'hypothèse que certaines communautés bactériennes pulmonaires ou certains métabolites du microbiote pulmonaire associé à l'HTAP pourraient jouer un rôle direct sur les cellules de la paroi vasculaire pulmonaire, et participer au remodelage vasculaire pulmonaire indispensable à l'établissement et/ou à la progression de l'HTAP.

Nous pensons que l'inventaire de la biodiversité du microbiote pulmonaire caractéristique de l'HTAP et de l'HTP expérimentale ainsi qu'une meilleure compréhension de son rôle dans certains mécanismes clés conduisant à la maladie, pourraient aboutir à l'identification de

nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic (métabolites bactériens circulants) de l'HTAP et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de cette pathologie grave.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'objectif général de la thèse est de décrire le rôle du microbiote pulmonaire dans le remodelage vasculaire pulmonaire et d'estimer son influence directe ou indirecte dans l'HTAP.

Cet objectif a été décliné en trois points :

- ⇒ Evaluer l'impact du microbiote sur l'architecture du poumon en post-natal dans un modèle de rats axéniques ;

- ⇒ Caractériser le microbiote pulmonaire et intestinal associé à la pathologie de l'HTP dans le modèle de rats MCT, d'un point de vue structural et fonctionnel, en se focalisant sur les bactéries productrices de métabolites potentiellement liés au remodelage vasculaire ;

- ⇒ Evaluer, *in vitro*, l'impact de métabolites bactériens candidats (tels que Butyrate et TMAO) et leurs interactions avec les cellules vasculaires pulmonaires de l'hôte afin de confirmer leurs implications dans le développement de l'hypertension pulmonaire expérimentale.

AXES DE TRAVAIL

- ❖ L'absence de microbiote impacte la structure pulmonaire post-natale et l'arbre vasculaire pulmonaire

- ❖ Impact du microbiote pulmonaire et des métabolites bactériens sur le remodelage vasculaire pulmonaire et l'HTAP
 - Étude comparative du microbiote intestinal et pulmonaire dans le modèle d'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat

 - Le butyrate, un métabolite bactérien, module le remodelage vasculaire et l'hypertension artérielle pulmonaire.

RESULTATS

I. OBJECTIF 1 : L'ABSENCE DE MICROBIOTE IMPACTE LA STRUCTURE PULMONAIRE POST-NATALE ET L'ARBRE VASCULAIRE PULMONAIRE

I.1. Rationnel

L'HTAP est une pathologie rare, sévère et incurable avec l'implication d'un remodelage des cellules du lit pulmonaire et une augmentation de la pression dans les petites artères pulmonaires entraînant in fine une insuffisance cardiaque droite. Les thérapies actuelles, essentiellement vasodilatatrices ne permettent pas la guérison même si elles améliorent les conditions de vie des patients. La recherche et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc nécessaire pour le diagnostic et une meilleure prise en charge des patients.

Des études basées sur la métagénomique fonctionnelle et sur des modèles d'animaux axéniques ont montré que le microbiote est associé à diverses maladies respiratoires. D'autres études ont démontré que le microbiote façonne le développement de l'hôte en influençant la maturation de plusieurs organes tels que l'intestin, le cerveau, le foie, les os, le système endocrinien, etc.

Toutes ces données nous ont amené à émettre l'hypothèse selon laquelle certaines bactéries et les métabolites qu'elles produisent pourraient influencer le développement de l'architecture pulmonaire et notamment de l'arbre vasculaire pulmonaire dans un modèle de rat axénique.

I.2. Objectif

Notre objectif dans ce chapitre était d'apporter les premiers indices sur le concept de l'influence d'un microbiote bactérien sur la formation de l'arbre vasculaire pulmonaire. Il s'agissait de rechercher si l'arbre vasculaire pulmonaire est différent chez les animaux Germ-Free en comparaison aux animaux conventionnels. Etant donné que les animaux conventionnels sont porteurs de plusieurs microbiotes (pulmonaire et intestinal, cutané, etc), cette approche intégrée ne permet pas de discriminer la contribution relative des différents écosystèmes, mais peut renseigner globalement sur l'impact de l'absence de microbiote sur l'architecture pulmonaire.

Pour ce faire nous avons comparé l'architecture pulmonaire et notamment l'arbre vasculaire pulmonaire chez des rats axéniques et des rats conventionnels dans une étude cinétique entre le Jour 1 et le Jour 28 en post-natal. Les approches utilisées ont été l'histologie couplée à l'imagerie quantitative utilisant un logiciel basé sur l'intelligence artificielle et l'apprentissage, l'immunohistochimie les profils d'expression de gènes d'intérêt.

Un autre volet prévu de cette étude était de comparer la susceptibilité des animaux conventionnels et axéniques à l'induction de la maladie par la monocrotaline. Malgré nos efforts acharnés pour obtenir l'autorisation à réaliser cette expérimentation, pendant 2 années, nous continuons à nous heurter à des remarques répétées du comité d'éthique dont dépend la plateforme Anaxem de MICALIS à l'INRAE, et ce volet n'a pas pu pour le moment être réalisé.

I.3. Résultats

La comparaison des rats axéniques et conventionnels a révélé de nombreuses anomalies pulmonaires structurelles chez les rats axéniques. En effet, les rats axéniques présentaient des alvéoles collapsées, des parois alvéolaires et vasculaires épaissies avec un nombre réduit d'alvéoles et une cellularité infiltrante très importante autour des alvéoles, dans les parois alvéolaires et dans les parois des vaisseaux pulmonaires avec la présence de foyers inflammatoires jusqu'au 7^e jour (J) après la naissance. Quant aux rats conventionnels, ils présentaient des alvéoles bien dilatées avec des parois alvéolaires très fines et très peu de cellularité. Ces anomalies pulmonaires précoces en postnatal se sont atténuées, voire n'étaient plus présentes à partir du jour 14 après la naissance. Nous avons constaté que ces anomalies s'accompagnaient d'une augmentation significative de l'expression de la protéine HIF-1 α chez les rats axéniques dès J1. On note également la présence de foyers inflammatoires chez les rats axéniques. Ces résultats suggèrent une réduction de la zone d'échange gazeux chez les rats axéniques, pouvant créer des conditions d'hypoxie. Après l'observation de ces anomalies de structures, nous avons cherché à caractériser la nature des cellules infiltrantes. Dans un premier temps, nous avons recherché si ces cellules infiltrantes avaient une capacité de prolifération. L'analyse immunohistochimique utilisant le marqueur de prolifération Ki-67 a révélé une augmentation significative des cellules infiltrantes proliférantes dans les vaisseaux, les bronches et les septa alvéolaires, accompagnée d'une augmentation significative de l'expression protéique de PCNA chez les rats axéniques jusqu'à J14 mais pas à J21 et J28.

Nous avons observé, chez les rats axéniques, d'énormes infiltrats cellulaires inflammatoires diffus jusqu'au 7^e jour après la naissance, qui ont diminué par la suite. L'immunomarquage à l'aide de CD45, CD3 et CD20 a révélé la nature lymphoïde T, B et myéloïde de ces cellules infiltrantes qui se sont réorganisées en foyers ressemblant à des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) à partir du 14^e jour, ce qui suggère une réponse immunitaire à un auto-antigène local dans le poumon des rats axéniques. Cela reste une hypothèse à explorer.

Enfin, nous avons observé une augmentation significative du nombre d'artérioles muscularisées chez les rats axéniques à des stades précoces après la naissance, suggérant un remodelage vasculaire précoce.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'absence de microbiote entraîne une réduction de la surface d'échange gazeux pulmonaire, mimant l'hypoxie, comme en témoigne l'expression augmentée de HIF-1 α . Les conséquences sont une muscularisation des petites artères pulmonaires, une infiltration et une prolifération de cellules myéloïdes et lymphoïdes dans les parois alvéolaires et vasculaires à un stade précoce après la naissance, et une néogénèse lymphoïde persistante. Ces observations laissent supposer qu'une éventuelle dysbiose microbienne dans les premiers jours de vie pourrait impacter l'architecture et l'arbre vasculaire pulmonaire, et potentiellement les fonctions pulmonaires. Des expériences sont programmées pour déterminer l'impact de l'absence de microbiote sur le développement de l'hypertension pulmonaire expérimentale.

Etat de la publication : en préparation, en attente de pouvoir réaliser le 2eme volet consistant à examiner la susceptibilité au développement de l'hypertension pulmonaire chez les rats axéniques.

I.4. Manuscrit associé

Lack of microbiota impacts the post-natal lung architecture and the pulmonary vascular tree.

Kouamé Firmin AKOUMIA^{1,2}, Maria-Rosa GHIGNA^{1,2}, Julie CADIOU³, Amandine LASHERMES³, Lucille PENALVA MOUSSET^{1,2}, Geneviève HERY-ARNAUD⁵, David MONTANI^{1,2,4}, Marc HUMBERT^{1,2,4}, Frédéric PERROS^{1,2}, Nicolas LAPAQUE^{2,3}, Sylvia COHEN-KAMINSKY^{1,2}

1. INSERM UMR_S 999 « Hypertension Pulmonaire Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.
2. Univ. Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, France.
3. Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Univ. Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France
4. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.
- 5 Inserm UMR 1078, Université de Bretagne Occidentale, UFR de Médecine, Brest, France

Corresponding author : Sylvia Cohen-Kaminsky, INSERM UMR_S999, Hôpital Marie Lannelongue, 133 Avenue de la Résistance, F92350 Le Plessis Robinson, France. sylvia.cohen-kaminsky@universite-paris-saclay.fr

ABSTRACT

Studies have shown a link between microbiota and various respiratory diseases. However, how the microbiome affects the normal pulmonary development is poorly understood. Here we hypothesized that the absence of microbiota influences lung development and pulmonary architecture, particularly the pulmonary vascular tree. As rats have bronchial circulation, we preferred to use this species instead of mice. We compared Fischer male axenic rats with conventional rats from day 1 to day 28 after birth. Quantifying alveolar and vascular wall thickness, alveolar partition, and markers was performed on whole lung images using machine learning-based software. Protein expression was studied by western blot. The comparative study revealed numerous lung structural abnormalities in axenic rats, such as an increase in septal and alveolar wall thickness associated with an increase in interstitial cellularity and a reduction in the number of alveoli from day 1 to day 7, attenuated thereafter, with a significant rise in HIF-1 alpha protein expression, suggesting a reduction in the gas exchange zone. Axenic rats had huge diffuse inflammatory cell infiltrates until day 7, which then decreased. Immunostaining with CD45, CD3, and CD20 revealed the T- and B-lymphoid and myeloid nature of these infiltrating cells, which reorganized into foci resembling tertiary lymphoid structures from day 14 onwards, suggesting an immune response to a local (self-)antigen in the lung of axenic rats. Ki-67 analysis revealed a significant increase in proliferating infiltrating cells in vessels, bronchi, and alveolar septa, with increased expression of PCNA in axenic rats. Finally, the number of muscularized arterioles was significantly increased in axenic rats at an early postnatal stage, suggesting pulmonary vascular remodeling evocative of pulmonary hypertension. Altogether, these results indicate that the absence of microbiota could lead to a reduction in pulmonary exchange surface mimicking hypoxia as evidenced by increased expression of HIF-1 α . Consequently, muscularization of the small pulmonary arteries happens, with infiltration and proliferation of myeloid and lymphoid cells in the alveolar and vascular walls at an early postnatal stage and then persistent lymphoid neogenesis. These observations suggest that possible microbial dysbiosis in the early days of life may impact the pulmonary architecture and vascular tree and potentially lung function.

Key words: axenic rats, lung, microbiota, vascular remodeling, lung architecture

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare, severe, and incurable condition involving the remodeling of the cells of the lung bed and increased pressure in the small pulmonary arteries leading ultimately to right heart failure ¹. Current treatments do not consider the role of the microbiota. Research and identification of new therapeutic targets are therefore necessary for diagnosis and better management of patients. With the discovery of high-throughput sequencing techniques and the development of bioinformatics tools, studies have shown that the human airways and lungs harbor a commensal microbiota that plays an important role in a variety of lung diseases ². These studies have demonstrated that this microbiota, traditionally considered a threat because of its association with various respiratory diseases ²⁻⁴, can have a beneficial influence on human health. This starts with a relationship between the host and its microbiota that begins very early, even before birth ^{5,6}. Monitoring studies have shown a difference between the bacterial communities of preterm and full-term infants 3-5. The transfer of the microbiome from mothers to human babies during birth shows that the mother's microbiota provides the first natural microbial exposure to the body habitats of the newborn ⁷. This early microbiota can then influence the development of the host and the pathologies it will face. Indeed, very early on, the microbiota shapes the development of the host by influencing the maturation of several organs such as the intestine ⁸, brain ⁹⁻¹¹, liver, bones, endocrine system, etc ¹². Early microbiota is known to influence brain development, oligodendrocyte differentiation, and myelination in the mouse central nervous system ¹², demonstrating the role of microbiota in host development. However, the lung also continues to develop after birth ¹³, probably also under the influence of maturation of the lung microbiota ¹².

All these data led us to hypothesize that certain bacteria and the metabolites they produce could influence the development of lung architecture and in particular the pulmonary vascular tree in an axenic rat model. In other words, the absence of microbiota could influence the development of the lung architecture and possibly the pulmonary vascular tree of the host. In order to understand how and by which mechanisms the microbiota might influence lung development, we compared the alveolar architecture and pulmonary vascular tree in axenic and conventional rats at different stages, from day 1 to day 28 after birth.

Axenic rats, also known as gnotobiotic rats, have no internal or external microorganisms ¹⁴. They were chosen as a model for comparison with conventional rats in this study for several reasons. As the aim of the study was to investigate the role of the microbiota on lung development, it was not possible to use antibiotic-treated rat models because in this model,

obtained following the administration of a cocktail of antibiotics, it is impossible to eliminate all the bacteria ¹⁵, and therefore, some bacteria still present could have influenced the results of this study.

MATERIALS and METHODS

Axenic (germ-free) and conventional rats

Germ-free (GF) and conventional (CONV) male Fischer rats (Fischer 344; age range 1-28 days) were used. GF rats were obtained from the Anaxem breeding unit, GF facility of the Institut Micalis (INRAE, Jouy-en-Josas, France) and CONV rats were purchased from the Charles River laboratory (L'Arbresle, France). All standard procedures, including the breeding of GF animals, were performed in France in approved animal houses (Anaxem approval number: B78-33-6). To maintain axenic status, GF rats were grown in sterile isolators and weekly; their sterility conditions were monitored by microscopic examination and screening culture in their faeces. Makrolon cages containing sterile bedding made of wood shavings housed the GF animals in the isolators. CON rats were maintained in a standard laboratory environment ¹⁶. GF rats had free access to autoclaved tap water and a standard gamma irradiated diet (45 kGy) (R03; Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France). CONV rats were exposed to ordinary tap water and the same (non-irradiated) diet. The animal room was maintained on a 12-hour light-dark cycle (lights on at 07:30-19:30). At different stages, the rats were sacrificed by decapitation and lung tissue was removed.

Lung tissue was collected at different stages after birth (days 1, 3, 7, 14, 21 and 28). All animal studies were approved by the user institution "INRAE, Animalerie Rongeurs de l'Unité Expérimentale "d'infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons" (EU IERP)" under approval C78-720. As all procedures were performed on sacrificed animals, it was not necessary to provide a project authorization application.

Axenic (germ-free) and conventional rats

Immunohistochemistry

Using a cannula placed in the trachea, the left lobe was filled with 4% formaldehyde and placed in the same fluid, and subsequently embedded in paraffin for histological analysis. Serial histological sections of 4 µm thickness were cut, deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin for morphometric analysis via CaseViewer software version

2.4.0.119028. The following antibodies, all purchased from Abcam, were used: Ki67 (Rabbit monoclonal ab16667); CD45 (Rabbit polyclonal ab10558); CD20 (Rabbit monoclonal ab64088); CD3 (Rabbit monoclonal ab16669) and α -SMA (ab5694).

Western blot

Western blot analyses were performed according to standard parameters. For the preparation of whole lung homogenates, tissues were homogenized and sonicated in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors, and 30 μ g of protein was subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Little Chalfont, UK). After blocking, the membranes were incubated overnight with the primary antibodies and then incubated for 1 hour with HRP-conjugated secondary antibodies. The following primary antibodies were used: PCNA (Dako, M0879); HIF-1 α (Cell Signaling Technology, CST 14179). Secondary antibodies for mouse anti-HRP (CST 7076S) and rabbit anti-HRP (CST 7074S) were purchased from Cell Signaling Technology. Protein revelation was performed by incubating the membranes in the dark for 4 minutes with ECL (enhanced chemiluminescence). Chemiluminescence is measured by a ChemiDoc transilluminator. Beta-actin was used as a loading control for normalization.

Quantification and Statistical analysis

Quantification of alveolar and vascular wall thickness, alveolar partition, and markers was performed using IPSDK software (Reactiv'IP) which is an artificial intelligence software based on machine learning, with object learning and segmentation. For each sample, 3 whole sections were quantified and averaged. All data are presented as mean \pm sem. A one-way and two-way ANOVA was used for overall comparisons using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). The Mann-Whitney test was used for non-parametric data. The difference between at least three groups was assessed with a one-way analysis of variance supplemented by Tukey's least significant difference post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at p values < 0.05.

RESULTS

Axenic rats display alveolar and vascular cellular infiltrates and a reduced number of alveoli.

The lung has several developmental stages from the embryonic phase to the alveolar phase, which continues until early childhood ¹⁷. Throughout these different developmental stages, abnormalities can occur that could impact on the health of the individual. To assess the contribution of the microbiota in the structural development of the lung, we looked at alveolation, which is the number of alveoli and their structure, by immunohistochemistry. This analysis revealed several pulmonary structural abnormalities related to the thickness of the alveolar and vascular walls, the number of alveoli, the cellularity around the alveoli and the shape of alveoli. Axenic rats had collapsed alveoli, thicker alveolar and vascular walls with a reduced number of alveoli and very high cellularity around the alveoli and in the walls of the pulmonary vessels, sometimes with the presence of inflammatory foci up to day 7 after birth. Conventional rats had well-dilated alveoli with very thin alveolar walls and very little cellularity around the alveoli (Figs 1A, 1B and 1C). These early lung abnormalities were attenuated or even completely disappeared by day 14 after birth (Figs. 1D, 1E, and 1F). Statistical analysis using the IPSDK machine learning based IPSDK software on the whole left lung showed that the percentage of alveolar wall area measured in proportion to the total surface area of the lung section, was significantly increased in axenic rats on day 1, day 3 and day 7 and remained elevated in axenic rats from day 14 to day 28 although not statistically significant (Fig. 1G). These abnormalities were accompanied by a significant increase in HIF-1 α protein expression in axenic rats at day 1 (Fig. 1H and 1I). We also noted the presence of huge diffuse inflammatory cell infiltrates up to day 7 in axenic rats, which then decreased from day 14 to day 28 (Figs. 1A, 1B, 1C, 1D, 1E and 1F). The increase in the alveolar wall thickness suggests a reduction in the gas exchange zone, and subsequent hypoxia leading to increase in HIF-1 α and inflammatory cell infiltration in axenic rats.

Axenic rats present proliferating cells in the bronchial, alveolar, and vascular walls

To further investigate the nature of the infiltrating cells, present in the alveolar and vascular walls of axenic rats, we investigated whether they were proliferating cells using Ki67 labelling. PAH is characterized by abnormal cell proliferation in the pulmonary vascular bed and increased expression of certain growth factors involved in this mechanism ¹⁸. We have shown a significant and diffuse increase in ki67-positive cells in axenic rats from day 1 to day 7 after birth, in the alveolar walls and septa as well as the pulmonary vessel walls (Fig. 2A, 2B, 2C and

2E). At day 14, these Ki67-positive cells tend to decrease in axenic rats evolving from diffuse distribution to clustering in the bronchial septa (Fig. 2D). This result is further confirmed by a significant increase in protein expression of the proliferation marker PCNA (proliferating cell nuclear antigen) in axenic rats (Fig. 2F and 2G).

The proliferating cells in the alveolar, bronchial, and vascular cells walls in axenic rats are myeloid and lymphoid cells.

To identify the nature of the infiltrating and proliferating cells, we first performed lung section staining to search for the presence of CD45 positive cells. CD45 is a member of the protein tyrosine phosphatase family. It is expressed by all nucleated hematopoietic cells¹⁹. We found a diffuse distribution of CD45-positive cells in the alveolar walls and septa as well as in the walls of the pulmonary vessels in axenic rats from day 1 to day 7 after birth (Fig. 3A, 3B, and 3C). These diffuse CD45-positive cells reorganized into foci from day 3 (Fig. 3D) and these inflammatory foci were significantly increased in axenic rats at day 14 (Fig. 3F). Statistical analysis revealed a significant increase in the number of CD45-positive cells in axenic rats on day 1, day 3 and day 7 compared to conventional rats (Fig. 3E). Thus, the infiltrating proliferating cells in axenic rats may belong to the myeloid and lymphoid lineages as assessed by CD45 staining.

Axenic rats present increased foci of T and B immune cells resembling to tertiary lymphoid structures.

We then further characterized the infiltrating and proliferating lymphoid cells using CD20 and CD3 labelling for B and T cell identification, respectively. We observed that the diffuse CD20-positive cells are visible from day 3 in axenic rats (Fig. 4A and 4B). From day 7 onwards, the diffuse CD20-positive cells are reorganized into foci localized at the vicinity of bronchi, and reminiscent of tertiary lymphoid structures (Fig. 4C). The number of these foci increased significantly by day 14 in axenic rats compared to conventional rats (Fig. 4D and 4E). We also showed CD3 positive foci in axenic rats from day 3 after birth (Fig. 3F). The number of CD3 foci increased significantly in axenic rats by day 14 (Fig. 4G and 4H). Thus, axenic rats present diffuse T and B positive cells early after birth that then reorganize into foci resembling to tertiary lymphoid structures potentially formed following lymphoid neogenesis in axenic rats.

Axenic rats exhibit an abundance of abnormally muscularized arterioles.

Muscularisation of small= pulmonary arteries (diameter < 50 μm) contribute to pulmonary vascular remodeling and PAH. To assess the impact of microbiota on arteriolar muscularisation, we quantified the number of muscularized arterioles in conventional and axenic rats using SMA alpha labelling. We found that the number of muscularized arterioles was significantly higher in axenic rats at an early postnatal stage (day 1 and day 3), and this was no longer visible after D3, suggesting transient vascular remodeling (Fig. 5A and 5B).

DISCUSSION

In this work, we investigated the impact of the lack of microbiota on the development of the pulmonary vascular tree and the structure of the alveoli including their septation. We identified a number of pulmonary vascular and alveolar abnormalities in axenic rats at early stages of post-natal development and the role these might play in the process of pulmonary vascular remodeling. In summary, our results showed firstly that alveoli are collapsed and reduced in number per lung zone in axenic rats with increased thickening of the pulmonary alveolar and vascular walls. Secondly, we found significant interstitial cellularity with a proliferative signature, involving inflammatory cells, myeloid cells and lymphoid cells, including T and B cells that reorganize into foci at later stages. Finally, we showed that the number of muscularized arterioles was significantly increased in axenic rats at an early postnatal stage, suggesting vascular remodeling. These observations indicate that the microbiota influences lung morphology and function.

We first examined structural abnormalities such as reduced number of alveoli and thickened alveolar walls and septa in axenic rats, which we observed from day 1 to day 7. Similar results indicating alveolar morphological differences (with a reduction in the number of alveoli) have been described in germ-free mice compared to wild-type and conventional C57BL6 mice ²⁰. The authors describe correcting this abnormality when germ-free mice were colonized by transplantation with a strain of *Lactobacillus*. However, in this study they do not mention the presence of alveolar wall and septal thickening. This could be due to the major anatomical difference in rats, that contrary to mice, have bronchial circulation ²¹. Leukocyte may be recruited through the bronchial circulation to the lung ²². Other studies have described similar abnormalities characterized by poor alveolar development, with thickened hypercellular septa in neonatal mice with overexpression of TGF- β 1 ²³, showing that lung immaturity may contribute to remodeling. It is known that the TGF- β pathway is deregulated in PAH patients ²⁴ and is important in pulmonary vascular remodeling ²⁵. Inhibition of alveolar development and

increased TGF- β in bronchoalveolar lavage (BAL) has been observed in rats exposed to hypoxia in the first 2 weeks of life but not in adulthood²⁶. Indeed, chronic hypoxia permanently inhibits alveolar development in animals during postnatal alveolar septation and leads to abnormal pulmonary arterial remodeling in neonates and infants, thus contributing to the pathogenesis of persistent pulmonary hypertension of the newborn²⁷ and bronchopulmonary dysplasia²⁸. Abnormal alveoli with increased alveolar wall thickness due to cell infiltration, could explain the increased protein expression of HIF-1 alpha in axenic rats in our studies. Indeed, we showed a significant increase in HIF-1 alpha in axenic rats at early stages (day 1 to day 7). In other studies, links have been found between microbiota and the development of organs such as intestinal crypts, lymphoid tissues and the blood-brain barrier^{9,20}. However, there are no studies comparing the development of PH in in vivo models between axenic and conventional rats to see how the absence of germs might influence the development of this rare condition. This could provide evidence for understanding the regulation of lung development by the microbiota.

In axenic rats, we also mentioned that the alveoli were collapsed. This could be due to a surfactant deficiency in axenic rats. Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a condition characterized by damage to the capillary endothelium and alveolar epithelium, with an important role for alveolar type I and II cells that produce surfactant(reference). Studies have shown that preterm infants have immature lungs that produce insufficient surfactant to reduce the surface tension between the air and the alveoli and are more likely to develop ARDS²². They therefore need respiratory support. The use of exogenous pulmonary surfactant in infants intubated immediately after birth or after developing ARDS has reduced the occurrence of pneumothorax, interstitial lung emphysema and neonatal mortality^{29,30}. In the context of COVID-19, it is described that the virus, by infecting type II alveolar cells, interferes with the production and secretion of pulmonary surfactant and thus causes an increase in surface tension, which in turn may lead to alveolar collapse and that the use of pulmonary surfactant seems promising as an adjunct therapy for the treatment of ARDS³¹. Due to the lack of anti-surfactant antibodies in rats, we could not validate this hypothesis of surfactant deficiency in axenic rats. This is therefore an issue for future studies.

Subsequently, we found significant interstitial cellularity, in the thicker alveolar septa and in the lung vessel walls, with a proliferative signature using Ki67 labelling. Investigation of the nature of these cells by CD45, CD3 and CD20 labelling showed that they were composed of immune myeloid and lymphoid cells, including T and B cells. Interestingly, these infiltrating CD45 positive myeloid and T (CD3 positive) and B (CD20 positive) lymphoid cells reorganized

into foci resembling tertiary lymphoid structures from day 14 onwards, suggesting an immune response to a local (self-)antigen in the lung of axenic rats. The presence of localized interstitial cells in the thicker alveolar septa and in the pulmonary vessel walls could be due to a disruption of the endothelial barrier and the cellular influx could participate in the vascular remodeling observed in PAH, indicating further evidence to support that the absence of microbiota could contribute to the development of pulmonary vascular remodeling and PAH^{25,32}. We did not have enough lung tissue in small post-natal lung for doing whole characterization of the lymphoid follicles. However, our results in the lung could be compared and discussed in the context to those of Yamanaka et al, demonstrating the presence of immature B cell follicles in germ-free rats in the intestine³³. Indeed, they showed that these B cell follicles did not have germinal centers (GC), unlike those in germ-free rats with microbiota transplantation which did, and these GCs were maintained throughout the experimental period (12 weeks)³³. There are several key differences between naive B cells and B cells within CGs. Naive B cells do not undergo much cell division and in addition to this, under germ-free conditions, B cells in lymphoid follicles did not express the apoptosis-preventing protein Bcl-2³³. The combination of lack of cell division and non-expression of Bcl-2 could explain their disappearance from day 14 after birth in their study. They also described a small number of T cells in germ-free conditions, mainly CD3 and CD4³³, which were less important than T cells in our study. They later confirmed that the CD4 cells observed in axenic rats were all CD3. In the axenic mouse, the spleen and lymph nodes are immature and Peyer's patches, which are inducers of immunity, are poorly developed^{33,34}. We also showed diffuse CD45 overexpression in axenic animals until day 7 with reorganization of these into foci. CD45 is a transmembrane glycoprotein, expressed on almost all hematopoietic cells except mature erythrocytes, and is a key regulator of T and B cell antigen, and is used as a diagnostic tool to distinguish immature lymphoblasts found in acute lymphoblastic leukemia³⁵. CD45 controls signaling pathways of the immune system and has therefore been studied as a therapeutic target for many immune diseases, including autoimmunity³⁶. One study showed that overexpression of PTPRC (CD45) indicates a poor prognosis and its expression level correlates with the level of infiltration of activated dendritic cells³⁷. All these studies suggest that CD45 overexpression in axenic rats could be a consequence of the presence of immature B and T cells.

Finally, we showed that the number of muscularized arterioles was significantly increased in axenic rats at an early postnatal stage, suggesting vascular remodeling³⁸. It has been reported that deregulated microbiota influences the epithelial barrier and inflammation as well as TGF- β production³⁹. Overexpression of TGF- β promotes increased collagen and α -SMA²³.

How long this vascular remodeling persists and if it is associated to abnormal lung function deserves to be investigated.

Taken together, our results suggest that the absence of microbiota influence lung development, alveolar structure and arterial remodeling. How the lymphoid follicles arise, whether it is in response to a local autoantigen, if they are mature and whether they are persistent or not after day 28, and if these lung abnormalities could participate to PH deserves further investigations. Inducing PH in axenic rats compared to conventional rats would bring evidence on the functional and pathophysiological consequences of the abnormal post-natal architecture of the lung observed in the absence of microbiota.

The main limitation of our study is that in axenic rats, all microbiota (intestinal, pulmonary, skin) are absent. It is therefore impossible to attribute the observed abnormalities to the absence of the pulmonary microbiota alone, which is of interest to us in this study given the pathophysiology of PAH.

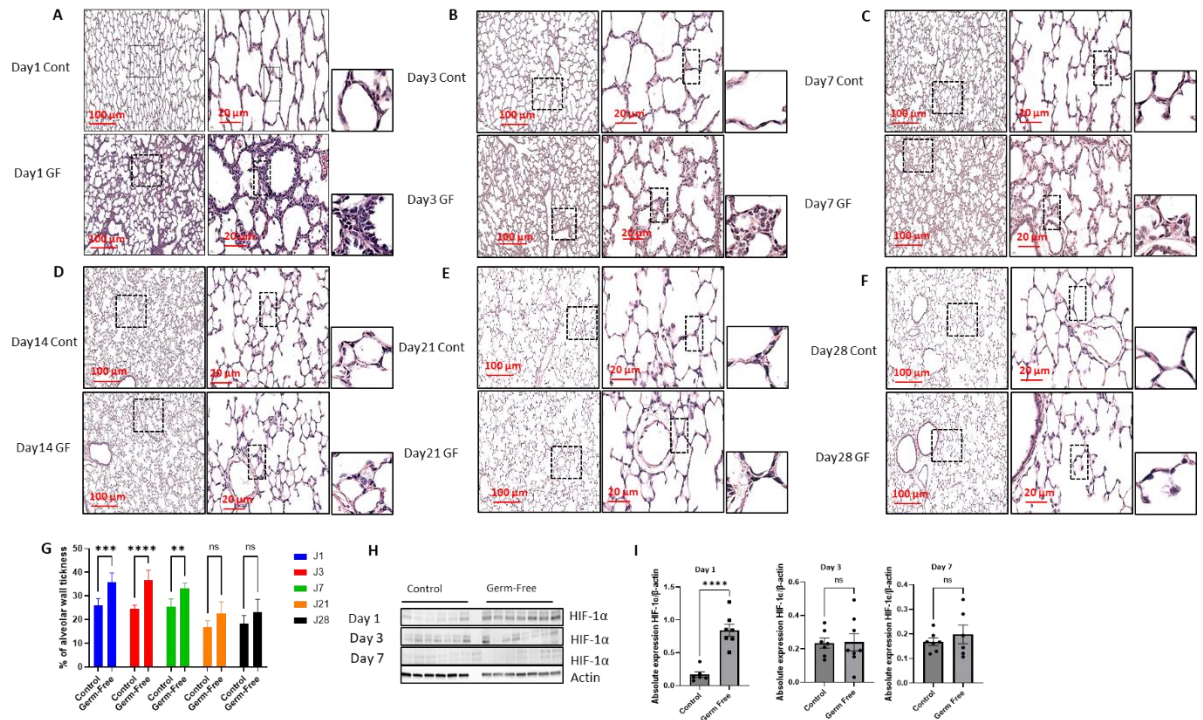


Figure 1. Lack of microbiota impacts lung structural development and HIF- α expression

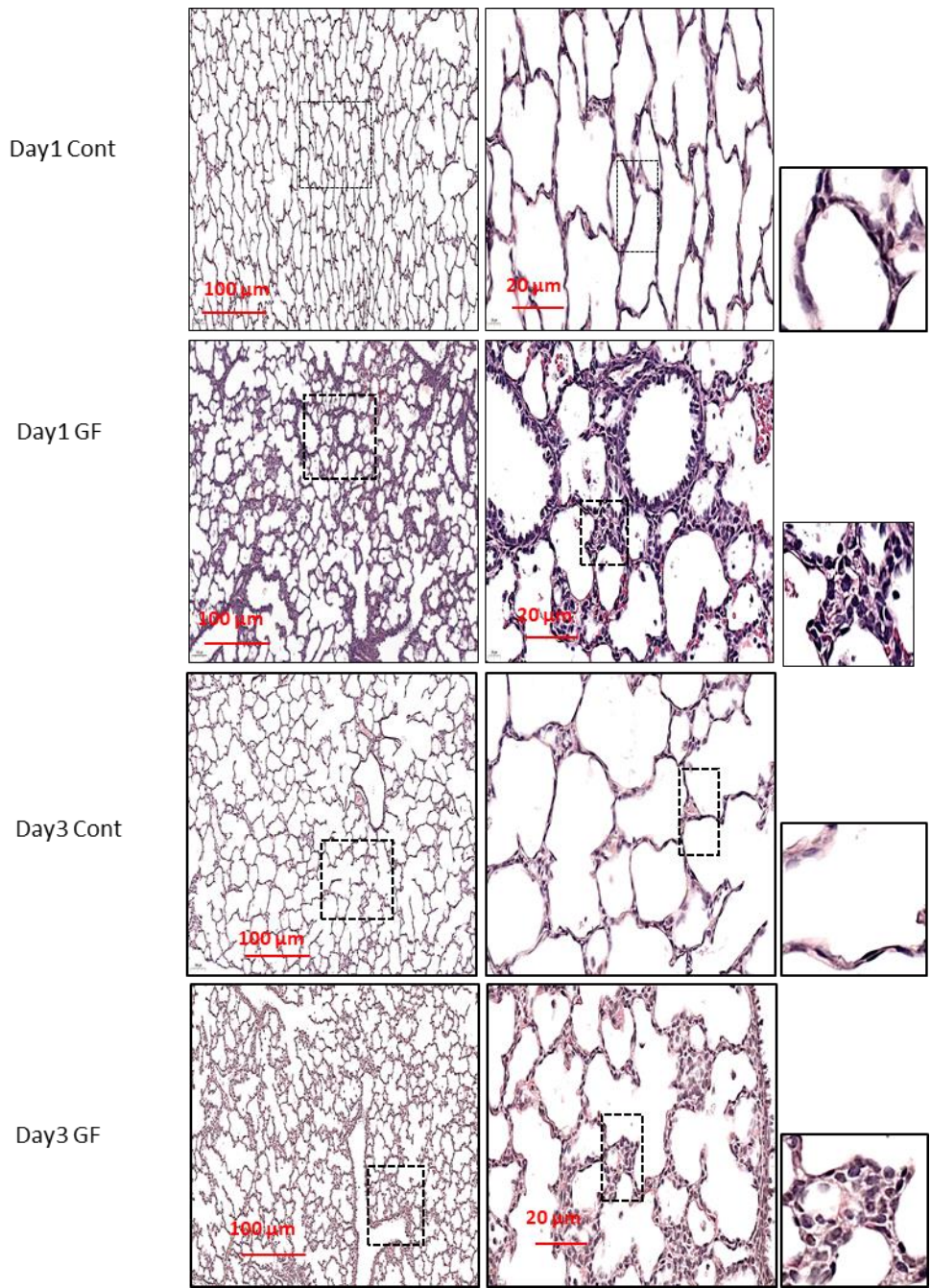


Figure 1 continued

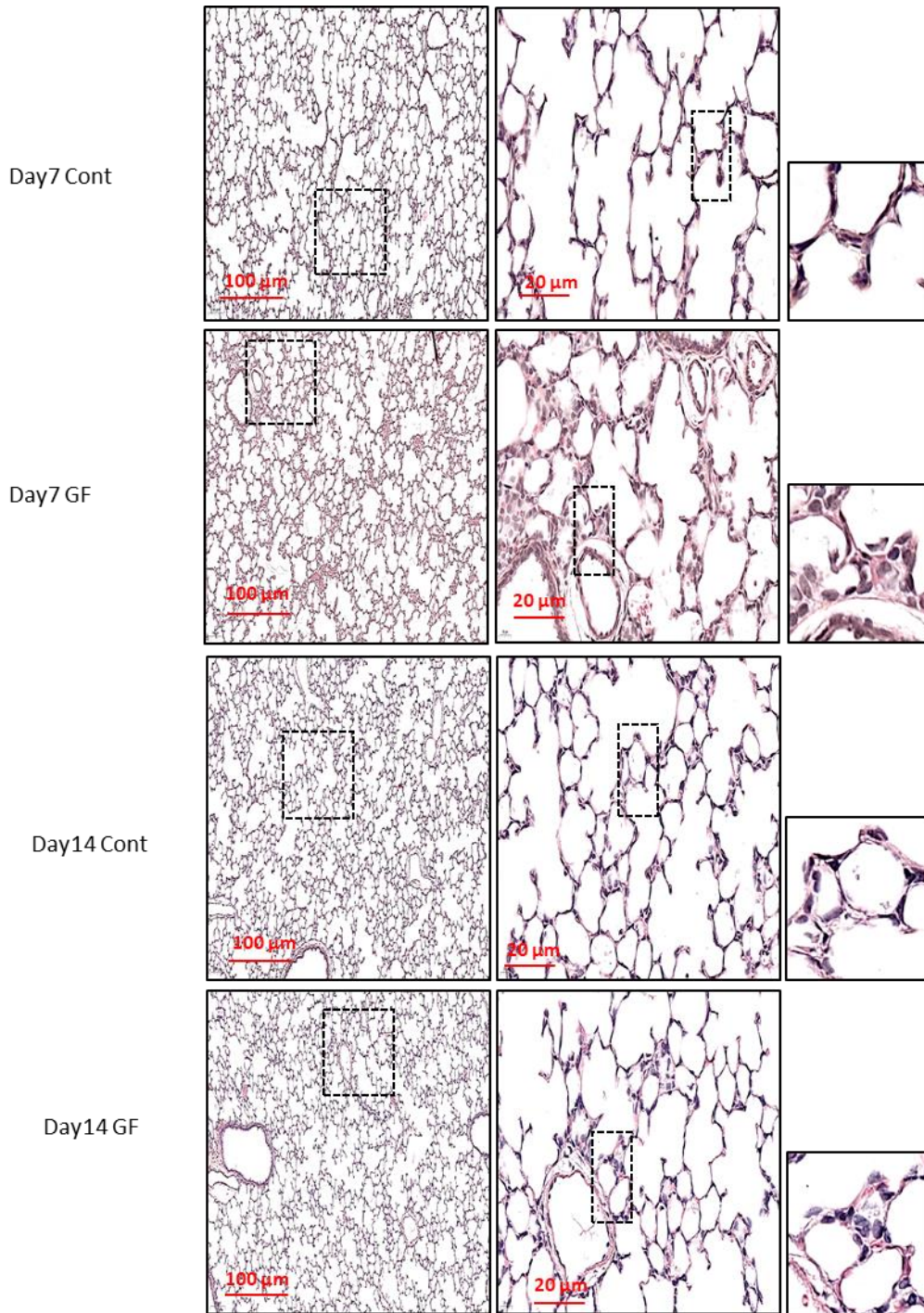


Figure 1 continued

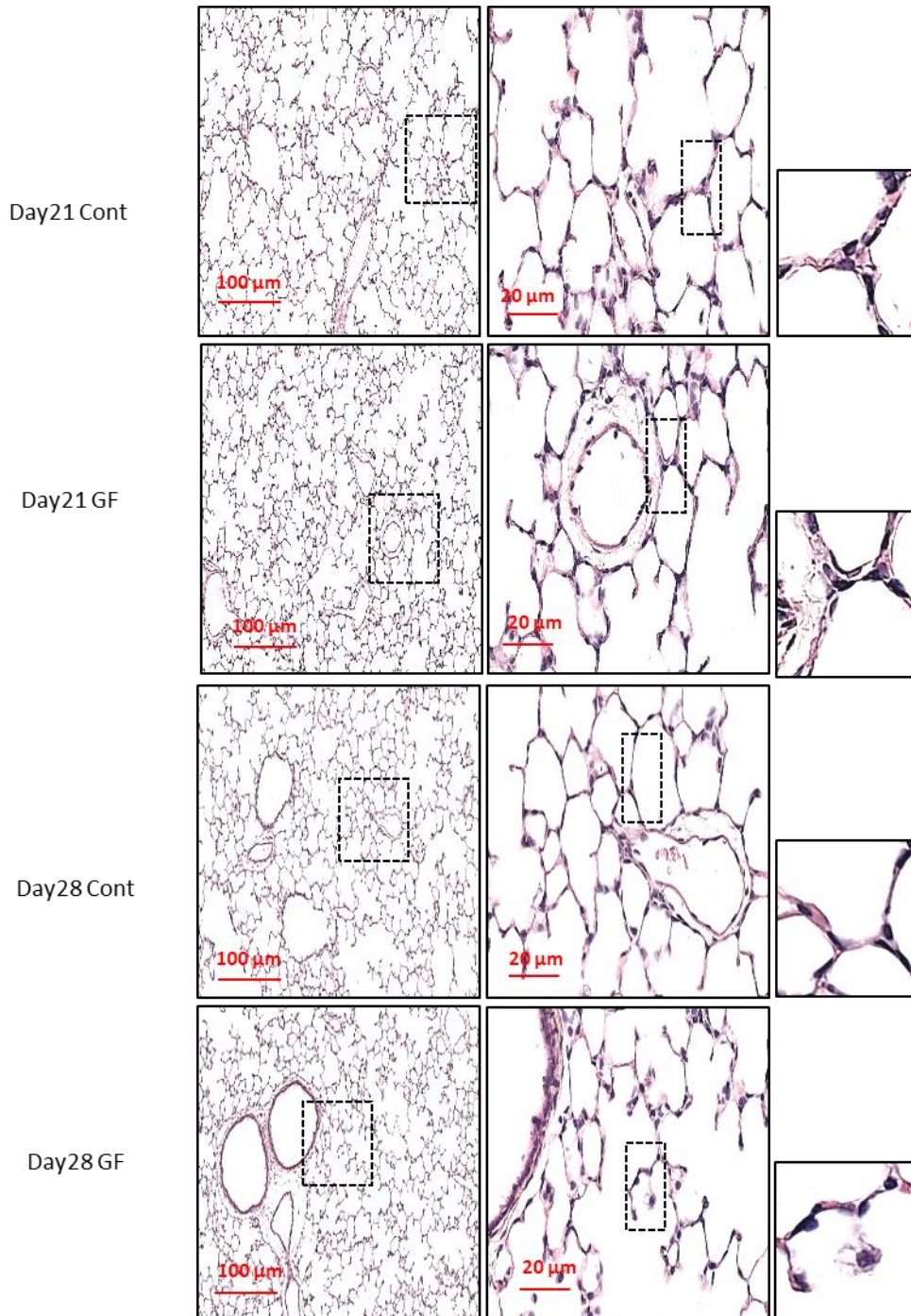


Figure 1 continued

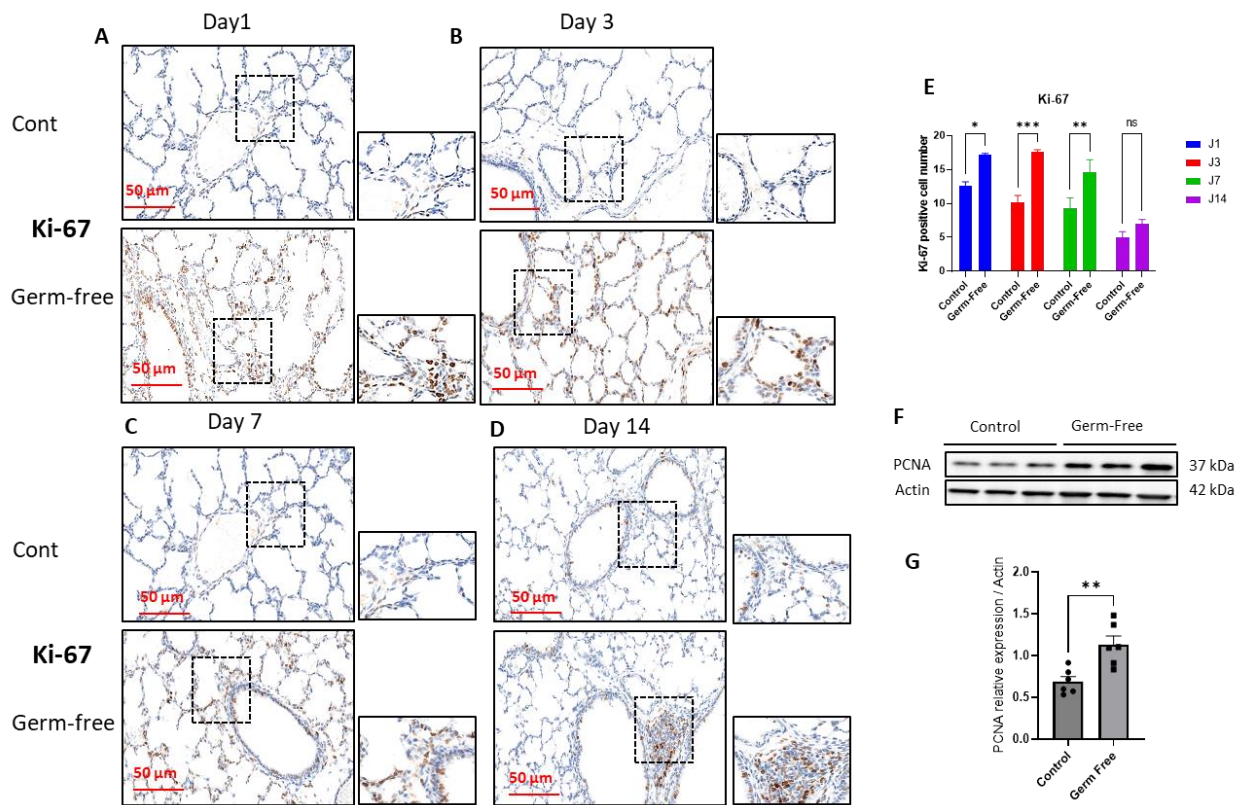


Figure 2. The absence of microbiota results in accumulation of proliferating cells in alveolar, bronchial and vascular walls

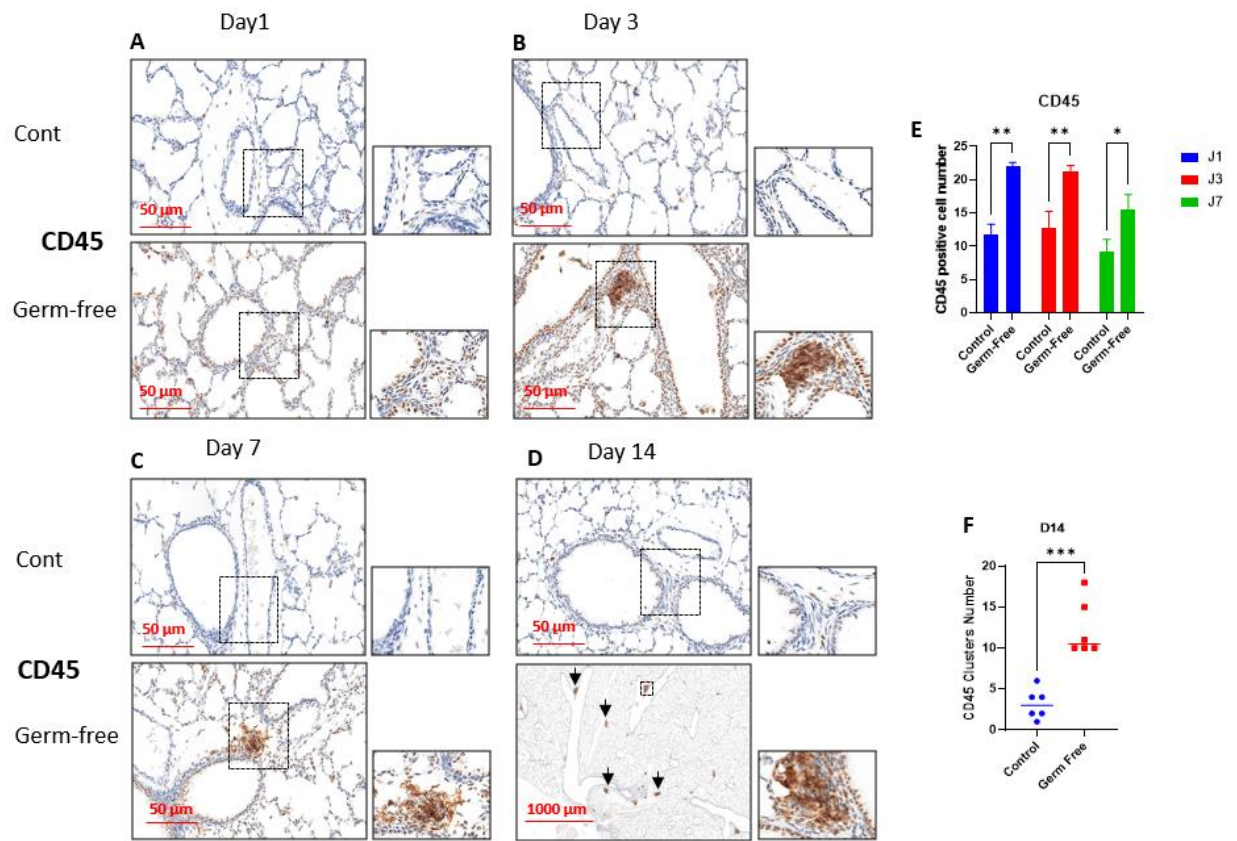


Figure 3. The absence of microbiota leads to early CD45+ cell infiltration and then increase of their clusterization into foci

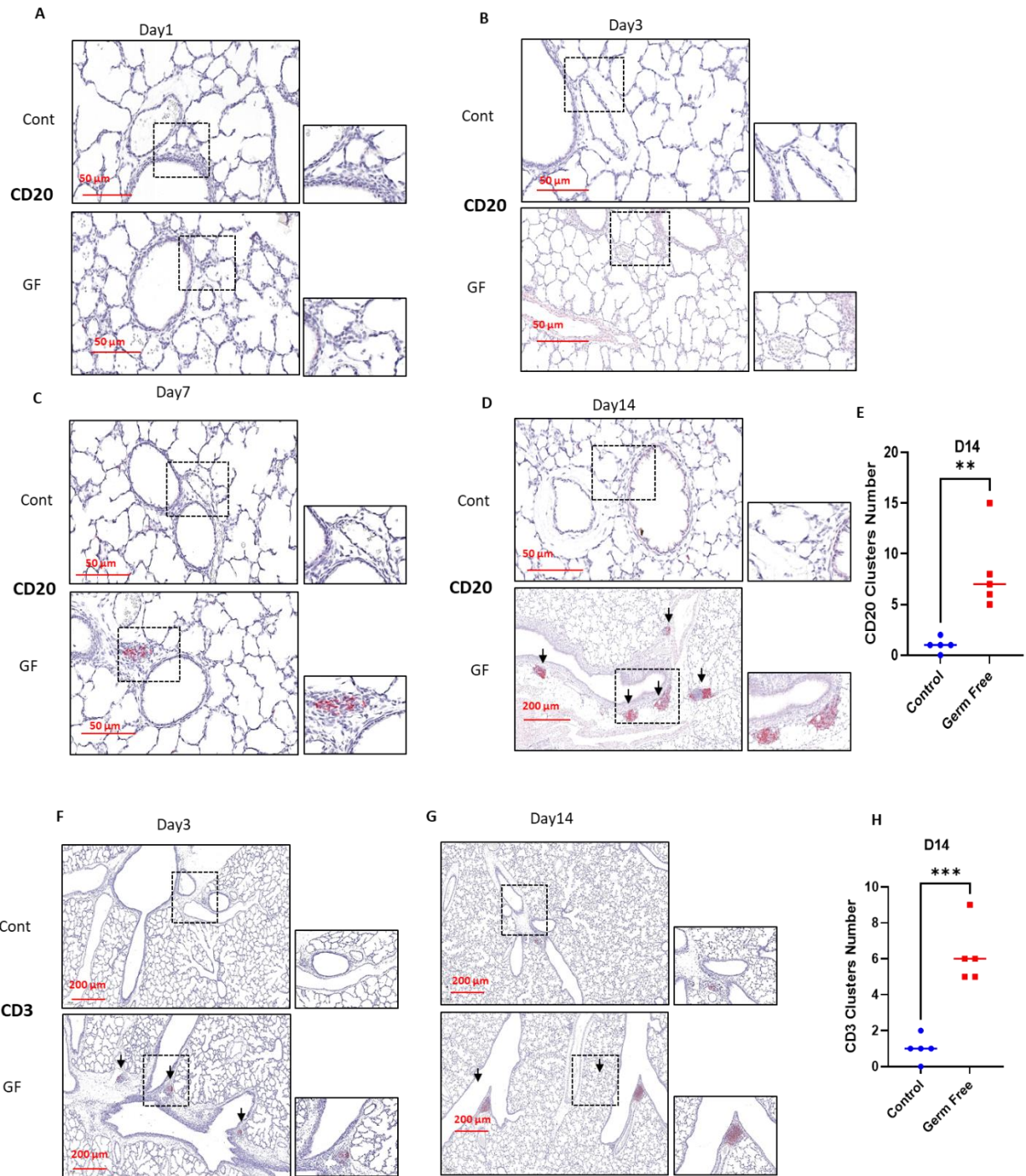


Figure 4. The absence of microbiota leads to the formation of T and B lymphocytes foci in axenic rats

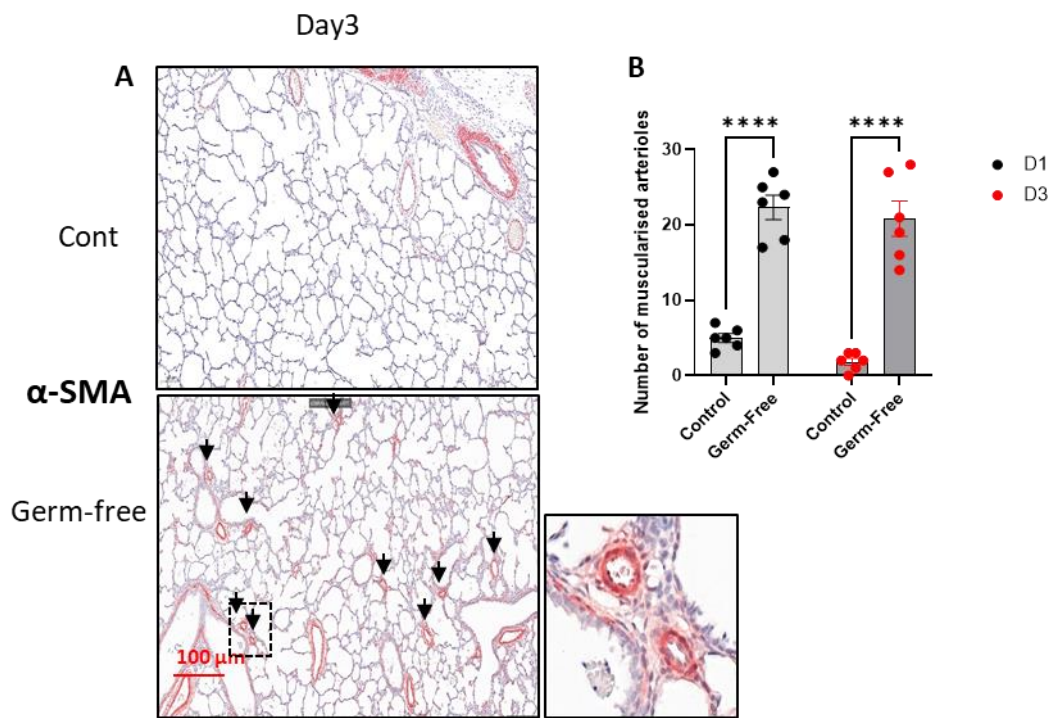


Figure 5. Absence of microbiota leads to increase in muscularized arterioles

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Lack of microbiota impacts lung structural development and HIF- α expression

Sections were stained with Hematoxylin Eosin and red bars indicate scale.

(A, B, C, D, E, F) Images showing vascular and alveolar abnormalities (alveolar and vascular wall thickening, reduced number of alveoli, collapsed alveoli, concentration of infiltrating cells around vessels and in alveolar walls, presence of inflammatory foci). (G) Representative graph of the quantification of the percentage of alveolar wall thickening. Quantification of alveolar and vascular wall thickness and alveolar partitioning was performed using IPSDK software (Reactiv'IP) which is an artificial intelligence software based on machine learning (object learning and segmentation). For each sample, 3 whole left lung sections were quantified and averaged. For conventional and germ-free rats ($n = 6$). (H, I) Representative images and Western blots quantification showing HIF-1 α expression on day 1, day 3 and day 7 in conventional ($n = 6$) and axenic ($n = 7$) rats. The Mann-Whitney test was used for non-parametric data. The difference between three or more groups was assessed using a one-way analysis of variance supplemented by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at p values < 0.05 . ns = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 2: The absence of microbiota results in accumulation of proliferating cells in alveolar, bronchial, and vascular walls

(A, B, C) Immunostainings showing a significant increase in infiltrating Ki67-positive cells with diffuse distribution in the alveolar walls and septa and pulmonary vessels in axenic rats. (D) Decreased number of Ki67 positive cells with reorganization into foci in the proximal bronchial walls in axenic rats. (E) Representative graph of the statistical analysis of the number of Ki67 positive cells. The counting of the number of Ki67 positive cells was performed using IPSDK software (Reactiv'IP) which is an artificial intelligence software based on machine learning (object learning and segmentation). For each sample, 5 sites were selected from 3 whole left lung sections and averaged, for conventional and germ-free rats ($n = 6$). (F, G) Representative images and Western blots quantification showing PCNA expression with a pool of samples from day 1 to day 14, in conventional rats ($n = 6$) and in axenic rats ($n = 6$). The Mann-Whitney test was used for non-parametric data. The difference between three or more groups was assessed using a one-way analysis of variance supplemented by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at p values < 0.05 . ns = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 3: The absence of microbiota leads to early CD45+ cell infiltration and then increase of their cauterization into foci.

(A, B, C) Immunostainings showing a significant increase in CD45 positive cells with diffuse distribution in alveolar walls and septa and pulmonary vessels in axenic rats. (D) Decrease in the number of CD45 positive cells in the alveolar walls and septa and pulmonary vessels with reorganization into foci in the vicinity of the bronchi. (E) Representative graph of the statistical analysis of the number of CD45 positive cells. (F) Quantitative analysis of the number of CD45 positive cells and foci. The counting of the number of CD45 positive cells was performed using IP SDK software (Reactiv'IP) which is an artificial intelligence software based on machine learning (object learning and segmentation). For each sample, 5 sites were selected from 3 whole lung sections and averaged, for conventional and germ-free rats (n = 6). The number of CD45 positive foci was counted in conventional rats (n = 6) and in axenic rats (n = 6). The Mann-Whitney test was used for non-parametric data. The difference between three or more groups was assessed using a one-way analysis of variance supplemented by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at p values < 0.05. ns = not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

Figure 4: The absence of microbiota leads to the formation of T and B lymphocytes foci in axenic rats.

(A, B) Immunostainings showing absence and presence of small numbers of CD20 cells on day 1 and day 3 respectively. (C) Appearance of B-cell foci in the vicinity of vessels and bronchi at day 7. (D) Presence of numerous B-cell foci in axenic rats at Day 14. (E) Quantification of the number of B-cell foci. (F) Appearance of T-cell foci in the vicinity of vessels and bronchi at day 3 (arrows). (G) Presence of numerous T-cell foci in axenic rats at day 14 (H) Quantification of the number of T cell foci. For each sample, 5 sites were selected from 3 whole sections and averaged, for conventional and germ-free rats (n = 6). The Mann-Whitney test was used for non-parametric data. Differences were considered statistically significant at p values < 0.05. ns = not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

Figure 5: Absence of microbiota leads to increase in muscularized arterioles.

(A) Images showing the presence of muscularized arterioles in axenic rats with the black arrows indicating muscularized arterioles. The sections were stained with α -SMA to visualize smooth muscle cells surrounding arterioles (B) Quantitative analysis of the number of muscularized

arterioles on day 1 and day 3 in conventional and axenic rats. For each sample, 5 sites were selected from 3 whole sections and the average was calculated, for conventional and germ-free rats (n = 6). The Mann-Whitney test was used for non-parametric data. Differences were considered statistically significant at p values < 0.05. ns = not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

Acknowledgments

Julie RIVIERE, from @BRIDGE (www.bridge.inrae.fr) for IHC

Conflict of Interest:

Sources of Funding

The LUMI project (Impact of LUng MIcrobiota in vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension: potential for innovative biotherapeutic target) was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) within ANR-18-CE14-0043 (to S.C-K).

From the French National Institute for the Health and Medical Research (INSERM), the University Paris-Saclay, the Groupe Saint Joseph Marie Lannelongue Hospital and Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569)

REFERENCES

1. Humbert, M. *et al.* 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* **43**, 3618–3731 (2022).
2. Budden, K. F. *et al.* Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol* **15**, 55–63 (2017).
3. Dumas, A., Bernard, L., Poquet, Y., Lugo-Villarino, G. & Neyrolles, O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell Microbiol* **20**, e12966 (2018).
4. Zhang, D. *et al.* The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases. *Frontiers in Microbiology* **11**, (2020).
5. Moles, L. *et al.* Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One* **8**, e66986 (2013).
6. DiGiulio, D. B. *et al.* Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* **3**, e3056 (2008).
7. Stark, P. L. & Lee, A. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. *J Hyg (Lond)* **89**, 59–67 (1982).
8. Hooper, L. V. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology* **12**, 129–134 (2004).
9. Diaz Heijtz, R. *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3047–3052 (2011).
10. Borre, Y. E., Moloney, R. D., Clarke, G., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential. *Adv Exp Med Biol* **817**, 373–403 (2014).
11. Borre, Y. E. *et al.* Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med* **20**, 509–518 (2014).
12. Lu, J. *et al.* Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Rep* **8**, 5443 (2018).
13. Kotecha, S. Lung growth: implications for the newborn infant. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* **82**, F69–F74 (2000).
14. Martín, R., Bermúdez-Humarán, L. G. & Langella, P. Gnotobiotic Rodents: An In Vivo Model for the Study of Microbe–Microbe Interactions. *Front Microbiol* **7**, 409 (2016).
15. Kennedy, E. A., King, K. Y. & Baldrige, M. T. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Front Physiol* **9**, 1534 (2018).
16. Bombail, V. *et al.* Odour conditioning of positive affective states: Rats can learn to associate an odour with being tickled. *PLoS One* **14**, e0212829 (2019).
17. Smith, L. J., McKay, K. O., van Asperen, P. P., Selvadurai, H. & Fitzgerald, D. A. Normal Development of the Lung and Premature Birth. *Paediatric Respiratory Reviews* **11**, 135–142 (2010).
18. Perros, F. *et al.* Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 81–88 (2008).

19. Saint-Paul, L., Nguyen, C.-H., Bastie, J.-N., Delva, L. & Quéré, R. CD45, une protéine phosphatase cible importante dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques. *Med Sci (Paris)* **32**, 1051–1053 (2016).
20. Yun, Y. *et al.* Environmentally Determined Differences in the Murine Lung Microbiota and Their Relation to Alveolar Architecture. *PLoS One* **9**, e113466 (2014).
21. Mitzner, W., Lee, W., Georgakopoulos, D. & Wagner, E. Angiogenesis in the mouse lung. *Am J Pathol* **157**, 93–101 (2000).
22. Davis, B. B. *et al.* Leukocytes Are Recruited through the Bronchial Circulation to the Lung in a Spontaneously Hypertensive Rat Model of COPD. *PLOS ONE* **7**, e33304 (2012).
23. Vicencio, A. G. *et al.* Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 650–656 (2004).
24. Tielemans, B., Delcroix, M., Belge, C. & Quarck, R. TGF β and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discovery Today* **24**, 703–716 (2019).
25. Botney, M. D., Bahadori, L. & Gold, L. I. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol* **144**, 286–295 (1994).
26. Vicencio, A. G., Eickelberg, O., Stankewich, M. C., Kashgarian, M. & Haddad, G. G. Regulation of TGF-beta ligand and receptor expression in neonatal rat lungs exposed to chronic hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **93**, 1123–1130 (2002).
27. Walsh-Sukys, M. C. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. The black box revisited. *Clin Perinatol* **20**, 127–143 (1993).
28. Goodman, G. *et al.* Pulmonary hypertension in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* **112**, 67–72 (1988).
29. Chakraborty, M. & Kotecha, S. Pulmonary surfactant in newborn infants and children. *Breathe* **9**, 476–488 (2013).
30. More, K., Sakhuja, P. & Shah, P. S. Minimally invasive surfactant administration in preterm infants: a meta-narrative review. *JAMA Pediatr* **168**, 901–908 (2014).
31. Cattel, F. *et al.* Use of exogenous pulmonary surfactant in acute respiratory distress syndrome (ARDS): Role in SARS-CoV-2-related lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* **288**, 103645 (2021).
32. Shimoda, L. A. & Laurie, S. S. Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension. *J Mol Med (Berl)* **91**, 297–309 (2013).
33. Yamanaka, T. *et al.* Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J Immunol* **170**, 816–822 (2003).
34. Bauer, H., Horowitz, R. E., Levenson, S. M. & Popper, H. The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *Am J Pathol* **42**, 471–483 (1963).
35. Al Barashdi, M. A., Ali, A., McMullin, M. F. & Mills, K. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). *J Clin Pathol* **74**, 548–552 (2021).
36. Rheinländer, A., Schraven, B. & Bommhardt, U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett* **196**, 22–32 (2018).

37. Guo, G., Li, B., Li, Q., Li, C. & Guo, D. PTPRC Overexpression Predicts Poor Prognosis and Correlates with Immune Cell Infiltration in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lab* **68**, (2022).
38. Jones, P. L., Cowan, K. N. & Rabinovitch, M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol* **150**, 1349–1360 (1997).
39. Pang, X. *et al.* Microbiota, Epithelium, Inflammation, and TGF- β Signaling: An Intricate Interaction in Oncogenesis. *Front Microbiol* **9**, 1353 (2018).

II. OBJECTIF 2 : IMPACT DU MICROBIOTE PULMONAIRE ET DES MÉTABOLITES BACTÉRIENS SUR LE REMODELAGE VASCULAIRE ET L'HTAP

II.1. Rationnel

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare, chronique et dévastatrice qui est due à une occlusion progressive des artères pulmonaires distales, avec pour conséquence une augmentation de la résistance vasculaire et de la pression artérielle pulmonaire moyenne, entraînant *in fine* une insuffisance cardiaque droite et la mort. Des facteurs prédisposants et/ou contributifs à la maladie tels que des mutations génétiques, le rôle de l'inflammation, la dysfonction endothéliale pulmonaire, la résistance à l'apoptose et la prolifération anormale des cellules de la paroi vasculaire ont été décrits. Le diagnostic se fait par le cathétérisme cardiaque, droit invasif et risqué, entraînant un diagnostic à des stades symptomatiques avancés. Il n'existe pas de traitements curatifs de l'HTAP et de biomarqueurs fiables à ce jour. Les thérapies disponibles restent essentiellement symptomatiques et palliatives et ciblent principalement la vasoconstriction résultant de la dysfonction endothéliale.

Il est maintenant clairement établi que la santé de l'homme dépend directement des écosystèmes microbiens faisant partie intégrante de notre corps. Les microbiotes humains (cutané, intestinal, pulmonaire) jouent un rôle important dans le maintien de la santé de l'homme. De nombreuses études ont permis d'associer des profils de communautés microbiennes de l'écosystème bactérien à diverses pathologies, notamment des pathologies respiratoires telles que l'asthme, la BPCO et la mucoviscidose. Au cours de ces études, l'existence d'un axe poumon/intestin a été mentionné dans les pathologies citées ci-dessus et également dans l'HTAP, avec la possibilité d'une translocation bactérienne directe/indirecte de l'intestin au poumon et des effets qui pourraient être médiés par des acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que le butyrate, le propionate, etc. Les connaissances restent limitées quant à la contribution réelle du microbiote pulmonaire et des métabolites qu'il produit localement dans le poumon, dans le développement de l'HTAP. Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat serait associée à une dérégulation du microbiote pulmonaire et intestinal, et dans un second temps, nous avons émis l'hypothèse que certains métabolites bactériens pourraient influencer, *in vitro*, dans des cellules vasculaires pulmonaires, les mécanismes clés du remodelage et *in vivo*, le développement de l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline (MCT) chez le rat.

II.2. Objectif

L'objectif de cette étude était :

- ❖ D'évaluer dans un premier temps, *in vitro*, l'impact de métabolites bactériens d'intérêt sur les processus de prolifération et de migration cellulaire, de résistance à l'apoptose, d'inflammation et tout autre indice du remodelage vasculaire lié à l'induction du phénotype pathologique dans les cellules vasculaires pulmonaires ;
- ❖ De rechercher dans un second temps, si le Sodium butyrate (NaBu), un métabolite exclusivement bactérien, a un impact *in vivo* dans le modèle d'hypertension pulmonaire induite par la MCT chez le rat et d'identifier les cibles de ce métabolite bactérien par une approche RNAseq.
- ❖ Enfin, de caractériser le microbiote intestinal et pulmonaire (LBA et parenchyme pulmonaire) dans le modèle MCT afin d'identifier des communautés bactériennes responsables de la dysbiose intestinale et pulmonaire éventuelle dans ce modèle d'hypertension pulmonaire.

II.3. Résultats

II.3.1. Étude comparative du microbiote intestinal et pulmonaire dans le modèle d'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat

La MCT a entraîné une augmentation attendue de la pression systolique du ventricule droit (RVSP) avec un débit cardiaque (CO) effondré chez les rats MCT après 21 jours. La résistance vasculaire pulmonaire (RVP) obtenue en calculant le rapport RVSP/CO est significativement augmentée chez les rats MCT. Les animaux malades ont développé une hypertrophie ventriculaire droite marquée, comme le montre l'augmentation du rapport ventricule droit/ventricule gauche + septum (indice de Fulton). En outre, les animaux MCT ont montré un remodelage de la paroi artérielle avec une musculation des petites artères et un épaississement des parois de l'artère pulmonaire.

Très peu d'études ont été réalisées sur le microbiote dans l'HTAP et ses modèles expérimentaux. La plupart des études sur le microbiote pulmonaire chez l'animal reposent sur l'étude du LBA.

L'originalité de notre étude repose sur la comparaison chez les mêmes animaux du microbiote intestinal, du LBA et du parenchyme pulmonaire dans un contexte sain et pathologique dans le modèle d'HTP induite par la MCT.

L'analyse de la composition des phyla a montré que les Firmicutes, les Bacteroidota et les Proteobacteria étaient les 3 phyla dominants dans le microbiote intestinal des rats témoins et MCT. Dans le microbiote pulmonaire, la composition bactérienne était dominée par 4 embranchements chez les rats témoins et MCT. Il s'agit des Firmicutes, des Bacteroidota, des Actinobacteriota et des Proteobacteria. Certaines bactéries comme les Actinobacteriota ne sont présentes que dans les poumons. La proportion de Bacteroidota est très faible dans les poumons par rapport à l'intestin chez les rats témoins. Les protéobactéries sont également plus abondantes dans les poumons que dans l'intestin. Dans le microbiote intestinal, nous avons observé une abondance relative (AR) plus élevée des Firmicutes chez les rats MCT alors que l'AR des Bacteroidota était plus élevée chez les rats témoins. Dans le microbiote du LBA, l'AR des Actinobacteriota était plus élevée chez les rats MCT que chez les rats témoins. Enfin, dans le parenchyme pulmonaire, l'AR des Protéobactéries et des Actinobactéries était plus élevée chez les rats témoins, tandis que l'AR des Bacteroidota était plus élevée chez les rats MCT. La richesse des trois sites d'échantillonnage (mesurée par l'indice Chao-1) était identique entre les rats témoins et les rats MCT. La diversité α mesurée par l'indice de Shannon et de Simpson n'a montré aucune différence significative entre les rats témoins et les rats MCT, quel que soit le site d'échantillonnage.

Comme mentionné plus haut, notre objectif était de comparer la composition des communautés bactériennes de chacun des trois sites et de voir si la distribution de celle-ci était spécifique à chaque site. L'analyse en composante principale (ACP) non supervisée a montré une séparation claire entre les deux niches intestin et poumon. Il est intéressant de noter que les communautés bactériennes du parenchyme pulmonaire étaient différentes de celles du LBA. Globalement, aucune différence n'a été observée dans la bêta-diversité entre les groupes de rats contrôle et MCT. Les trois types de microbiote étudiés partagent des familles bactériennes appartenant aux quatre embranchements (Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria et Actinobacteriota). L'analyse multivariée supervisée sur la matrice intestinale a montré une séparation nette entre les rats témoins et les rats MCT. Il est intéressant de noter que le microbiome intestinal des rats témoins est caractérisé par des familles appartenant à différents phylums, alors que celui des

rats MCT est dominé par des familles qui appartiennent toutes au phylum des Firmicutes. Cette proportion élevée de Firmicutes dans le microbiote intestinal des rats MCT contribue à la dysbiose intestinale. En effet, le ratio Firmicutes/Bacteroidota était plus élevé dans le microbiote intestinal des rats MCT, ce qui est considéré comme une caractéristique de la dysbiose intestinale. Le groupe MCT était fortement corrélé à trois familles bactériennes : *Monoglobaceae*, *Oscillospiraceae* et *Clostridiaceae*.

L'analyse multivariée supervisée sur la matrice du microbiote du LBA a séparé les rats témoins des rats MCT. Les rats MCT étaient corélés positivement aux *Bifidobacteriaceae* (Actinobacteriota). L'analyse multivariée supervisée du microbiote du tissu pulmonaire a séparé les rats témoins des rats malades avec une corrélation positive entre les rats témoins et les *Lachnospiraceae* ainsi que les *Pseudomonaceae*. Quant aux rats MCT, ils étaient corélés positivement avec les *Corynebacteriaceae*.

Nos résultats montrent une séparation nette entre les communautés bactériennes en fonction du site de prélèvement. En effet, le microbiote pulmonaire est très différent du microbiote intestinal. Ce qui indique clairement la présence d'un écosystème bactérien résident au niveau du poumon qui aurait la capacité de réguler le développement de l'HTP chez le rat dans le modèle MCT.

Statut de l'article : prêt à soumettre

Manuscrits associés

Comparative study of gut and pulmonary microbiota in monocrotaline-induced pulmonary hypertension model in rats.

Kouamé Firmin AKOUMIA^{1,2}, Lourdes VELO*⁵, Lucille Penalva Mousset^{1,2}, Rosyne LAGRAFEUILLE⁵, Stephanie GOURIOU⁵, Julie CADIOU³, Amandine LASHERMES³, Frédéric Perros^{1,2}, David Montani^{1,2,4}, Marc HUMBERT^{1,2,4}, Nicolas LAPAQUE³, Sylvia COHEN-KAMINSKY^{1,2}, Geneviève HERY-ARNAUD⁵,

*These authors contributed equally to the work

** These authors contributed equally to the work

1 Inserm UMR_S 999, LabEx LERMIT, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

2 Univ. Paris-Saclay, Faculté de Médecine, France.

3 Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Univ. Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

4AP-HP, Public Assistance-Paris Hospitals, Reference Center of Severe Pulmonary Hypertension, DHU Thorax Innovation, Hôpital Bicêtre, France.

5 Inserm UMR 1078, Université de Bretagne Occidentale, UFR de Médecine, Brest, France

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and incurable disease. The role of the lung microbiota is increasingly associated with respiratory diseases. However, the role of the pulmonary microbiota and its metabolites is not considered in the current treatments of PAH. The lung microbiota has been poorly studied in PAH and its experimental model, particularly the lung microbiota and its comparison with the gut. In this study, we analyzed changes induced in the gut and lung microbiota, in a model of pulmonary hypertension (PH) induced by a single dose of 60 mg/kg monocrotalin (MCT) in male Wistar rats. After 3 weeks, as expected, MCT induced an increase in right ventricular systolic pressure, hemodynamics, and pathological changes associated with PH. Fecal samples were used to study the gut microbiota, and two different sampling sites of the lower airway microbiota, the lung parenchyma and the bronchoalveolar lavage (BAL) were used to study the microbiota by 16S rRNA gene sequencing and bioinformatic analysis. A clear separation was observed between control and MCT rats in the composition of intestinal and pulmonary microbiota and, within pulmonary microbiota, between the lung parenchyma and the BAL. We did not observe a difference in biodiversity between control and MCT rats at any sampling site analyzed. However, the Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio was increased in MCT rats in the gut microbiota. The gut microbiota of MCT rats was composed mainly of bacteria belonging to the phylum Firmicutes, whereas that of control rats was composed of bacteria belonging to several phyla. The relative abundances of *Oscillospiraceae* and *Lachnospirareae* were significantly higher in the gut microbiota of MCT rats. The phylum Actinobacteriota was present primarily in the lower respiratory microbiota, with an increase in *Bifidobacteria* in the BAL microbiota of MCT rats. In the lung tissue microbiota, we noted a decrease in Proteobacteria accompanied by an increase in Bacteroidota in MCT rats. In conclusion, the composition of the gut microbiota and that of the lower respiratory tract were impacted during the development of PH induced by MCT in rats. Further study of the observed changes may allow understanding how the lung microbiota regulates the mechanisms of pulmonary hypertension.

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare, severe, and incurable disease characterized by pulmonary vascular remodeling resulting in hypertrophy and remodeling of the right ventricle. Patients with this disease die of right heart failure. The hemodynamic parameters observed during right heart catheterization allow the diagnosis of this disease by measuring mean arterial pressure (PAPm), which is greater than 20 mmHg at rest, pulmonary vascular resistance (PVR), which is greater than 2 Wood's units (WU), and pulmonary artery occlusion pressure (PAPO), which is less than or equal to 15 mmHg¹. PAH is a disease with real difficulties such as the lack of reliable biomarkers and effective and rapid screening tests for early diagnosis. There is also no curative treatment for PAH. The current treatments, validated by the Food and Drug Association (FDA), mainly target the endothelin pathway with endothelin receptor antagonists, the NO pathway with phosphodiesterase 5 inhibitors and soluble guanylate cyclase activator, and the prostacyclin pathway with prostacyclin analogs and prostacyclin- receptor agonists². The microbiota in general and the lung microbiota (LUMI) in particular, have not yet been considered in PAH treatment strategies. The discovery of LUMI is recent and therefore there are very few studies in this area showing clear links with the development of PAH. Therefore, determining the role of LUMI during pulmonary vascular remodeling, characteristics of PAH, identifying bacterial or metabolic biomarkers for diagnosis, and developing new therapeutic treatments would help for better management of patients. Knowledge about the existence and composition of LUMI has been made possible by scientific advances, notably by the discovery of high-throughput sequencing techniques in 2010. Studies have shown that the lungs of healthy people contain a microbiota, which has been characterized³⁻⁶. This major discovery prompted studies on the correlation between LUMI imbalance and chronic respiratory diseases such as idiopathic pulmonary fibrosis⁷, COPD⁸, asthma⁹, bronchiectasis¹⁰ and recently COVID-19¹¹, thus raising the thorny question of the role of LUMI in respiratory health.

These few studies suggest a link between certain bacterial communities or metabolites and these conditions and their likely use as predictive biomarkers of these respiratory conditions. Pharyngeal swab samples from patients with pulmonary hypertension (PH) and hemophilia have been analysed.¹² A clinical trial revealed that bacteria in the airway microbiota such as *Streptococcus* and *Prevotella* were associated with elevated expression of thrombospondin-1, which regulates a set of genes characteristic of extracellular matrix production such as metalloproteinases¹³ that are predictive biomarkers of PAH severity and mortality¹⁴. *Veillonella*

and *Prevotella* in bronchoalveolar lavage (BAL) LUMI correlated positively with elevated levels of several pro-inflammatory cytokines¹⁵ which are key players in pulmonary vascular remodeling observed in PAH and are used as biomarkers of the disease^{16,17}. In mice, large amounts of dietary fibers have been shown to regulate the immune system in the lung and attenuate inflammatory responses¹⁸. Indeed, short chain fatty acids (SCFAs) produced by gut bacteria enter the lungs via the circulation and locally regulate the immune response and play a role in perivascular inflammation and pulmonary vascular remodeling¹⁹, a mechanism mediated via the so-called gut-lung axis. Bacterial dysbiosis is thought to be associated with pathophysiology in a model of PH by regulating immunological, hormonal and metabolic homeostasis²⁰ thus contributing to disease exacerbation.

All these reports showing a link, admittedly not very well elucidated, between microbiota and respiratory diseases have provoked the setting up of clinical trials based on probiotic supplementation for the treatment of respiratory pathologies. Thus, interesting results have been obtained such as the reduction of vascular endothelial disorders and biomarkers of systemic inflammation in patients with stable coronary heart disease²¹. In mice, PH induced by postnatal growth restriction could be reversed by probiotic treatment²². Other studies have reported that some probiotics reduce blood pressure in hypertensive patients²³ and in spontaneously hypertensive rats²⁴. The gut microbiota remains by far the most studied in respiratory diseases, however, as it stands, very little work has been done to understand the role of the lung microbiota in PAH, mainly on samples from sites far removed from the pulmonary vascular bed (fecal samples, nasopharyngeal or oropharyngeal swabs). This poses a problem of relevance and well-established evidence for understanding the role of LUMI in PAH.

In the present study, we hypothesized that the development of PH might be associated with changes in both pulmonary and intestinal microbiota, with the challenging goal of studying the microbiota of the lung parenchyma in addition to the more commonly studied BAL in respiratory diseases. To test this hypothesis, we performed microbiota analysis of these sites in a monocrotaline-induced PH rat model. We characterized and compared the gut microbiota and the lower airway microbiota (BAL and lung parenchyma) of PH rats versus control rats, by 16S rRNA sequencing to search if there is MCT-induced gut and/or lung dysbiosis in this model of PH.

MATERIALS and METHODS

Animals

The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N° A94046247) from METABRAIN RESEARCH. This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEEA26 (Animal Experimentation Ethics Committee no. 26). The animal experiments were performed in compliance with the guidelines from Directive 2010/63/EU on 22 September 2010 of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and complied with the French institution's guidelines for animal care and handling.

Monocrotalin (MCT) rat model

Five-week-old male Wistar rats (200 g) were used and maintained in a temperature-controlled room with a 12:12 light-dark cycle. The *in vivo* experimental setup was as follows: pulmonary hypertension was induced in the rats by a single subcutaneous injection of monocrotaline (MCT; 60 mg/kg) on day 1. MCT was dissolved in HCl (1 N) and neutralized with NaOH (1 N). Hemodynamic parameters for the assessment of pulmonary hypertension and various biological samples for the study of microbiota were taken on day 21. This model is routinely practiced in our laboratory²⁵⁻²⁷.

Measurement of hemodynamic parameters

Hemodynamic measurements were performed 21 days after exposure to MCT and treatment with (NaBu). Rats were placed under general anesthesia and spontaneous respiration with an Isoflurane Rodent Anesthesia System (Minerve, Esternay, France) (maintenance: 2% isoflurane in room air). Hemodynamic measurements, such as right ventricular systolic pressure (RVSP; mmHg) and cardiac output (CO; mL/min) were performed. After the assessment of RVSP and CO, we inserted a catheter into the carotid artery to measure systemic blood pressure. All analyses were performed in a blinded fashion: the experimental conditions of the rats were unknown to the operator during catheterization and data interpretation. PVRs were assessed by calculating the RVSP/CO ratio. The Fulton index measuring right ventricular (RV) hypertrophy is calculated as the ratio of RV weight to left ventricular (LV) plus septal (S) weight (RV/LV + S). Under deep anesthesia (5% isoflurane), the animals were euthanized by exsanguination for tissue collection for molecular biology analyses^{25,27}.

Biological samples for the analysis of gut microbiota and lower airways (BAL and parenchyma)

For the study of the gut microbiota, we collected fresh fecal samples from rats on day 21 of the experimental procedure, and we immediately froze them at -80°C . (BAL) was performed by injecting 8 mL of NaCl into the lungs of the rats using a syringe and cannula. This fluid was then collected by aspiration and frozen directly at -80°C for microbiota analysis. BAL was performed after the rat was sacrificed. A biopsy of lung parenchyma was taken from the dead animal for the study of the pulmonary microbiota.

Analysis of pulmonary vessel remodeling

Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and serially sectioned (5 μm). Morphometric analyses were performed on hematein-eosin-Safran (HES) stained sections. Lung samples from all conditions were analyzed by conventional light microscopy using semi-automated quantitative software (NIS-BR; Nikon, Champigny sur Marne, France). Vascular remodeling was assessed in all pulmonary vessels larger than 50 μm and smaller than 100 μm that were identified in 20 randomly selected microscopic fields per tissue section. Vessels were classified into two groups: the number of muscularized arteries and the number of occluded arteries ²⁷.

Immunofluorescence staining

Frozen lung sections (6 μm) were air-dried. The sections were fixed with paraformaldehyde (PFA 4%) for 10 min at room temperature. The free aldehyde groups from the PFA fixation were soaked for 10 min with a 50 mM NH_4Cl solution. The sections were blocked with human (10%) or rat (10%) serum in PBS for 1 h at room temperature. We used primary antibodies against VWF (1/400, Dako A0082) and α smooth muscle actin (α -SMA, Sigma, F3777) (1/200). Primary antibody detection was performed with goat anti-rabbit secondary antibodies (1/200). Slides were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ²⁷.

Microbiota analysis

DNA extraction of fecal samples (200 mg) was performed using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA extraction of 1 mL-BAL samples was performed using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen) according to Le Gal et al. ²⁸.

DNA extraction of lung biopsies (200 mg) was performed using the Ultra Deep Microbiome Prep (Molzym, Germany) according to Lagrèfeuille et al. (2023). Environmental DNA contamination was excluded by processing a negative control for each extraction series that followed each step of 16S DNA sequencing.

PCR amplified the V3-V4 regions of the 16S rRNA bacterial gene. The PCR was conducted with a mix of 5 µL of extracted DNA, 25 µL of KAPA HiFi Hotstart ReadyMix (Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa), 17 µL of water, 1.5 µL of 10 µM 341F forward primer (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG – 3') and 1.5 µL of 10 µM 785R reverse primer (5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') [14]. The PCR cycles consisted of 3 min at 95°C, followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 59°C for 30 s, and 72°C for 30 s, then followed by 5 min at 72°C. Amplicon libraries were normalized and sequenced on Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) modified to generate 300 bp paired-end reads using PE300, 600 cycle kits (Genomer platform, Biogenouest®, Roscoff, FR). Extraction-negative controls were processed in parallel. A positive control composed of a mixture of known microbial compositions (ZYMO D6305, ZymoBIOMICS) was also processed and sequenced in parallel to each pool of study samples.

Bioinformatics and statistics

Sequence data were demultiplexed and split by forward and reverse FASTQfiles. The FastQC²⁹ and MultiQC³⁰ tools assessed the quality of demultiplexed raw sequence reads. We used CutAdapt³¹ and bbduk³² to remove primers and keep sequence quality scores uniformly higher than 20. DADA2³³ was used to infer amplicon sequence variants (ASVs) and assign taxonomy to ASVs. Sequencing reads were dereplicated and pooled, and ASVs were inferred for each sample via the DADA2 sample inference algorithm and the estimated error model. Denoised sequences were generated by merging forward and reverse reads. Chimeric sequences were identified by precisely reconstructing them by combining left and right segments of more abundant sequences and then removed from the ASVs table of denoised merged sequences. Taxonomy was assigned to each ASVs using the SILVA version 138³⁴ species classifier implementation for DADA2. We removed any ASVs that were not bacterial and collapsed ASVs (into OTUs) using dbOTU³⁵ and the clustering algorithm TreeCluster³⁶ at 98% on a SATé-enabled phylogenetic placement (SEPP) tree³⁷.

Spurious ASVs, defined as ASVs with < 5 reads across all sequenced biological specimens and no-template control, were removed. We assessed nucleic acid extraction and sequencing efficiency by comparing the mock bacterial community extraction and sequencing controls to the manufacturer profiles. We used the microDecon³⁸ package to identify potential contaminants using sequence data from biological specimens and extraction-negative controls.

Statistical analysis was performed using R statistical software (version 4.2.1). Descriptive/core microbiome analysis was conducted using OTUs in more than 50% of the samples using the mia and miaViz package. Alpha diversity indexes were estimated using the iNEXT-package from non-filtered clusters³⁹. Supervised (Partial-Least-Squared discrimination analysis, PLS-DA) and unsupervised (Principal Component Analysis, PCA) multivariate analysis were performed on OTUs found in more than 90% of total samples. Beta diversity was determined using Euclidean distances of centered log-ratio (CLR) transformed OTU counts (Aitchison distance) after applying a pseudo count of one or by Bray-Curtis dissimilarity index on unrarefied OTU counts, all implemented using distance in the PHYLOSEQ and pca/plsda functions mixOmics package. Lefse differential abundance analysis was carried out using the microbiomeMarker package. Generic statistical analysis was done with the base stats package in R.

RESULTS

Hemodynamics and vascular remodeling

MCT injected into rats on day (D) 1 resulted in an expected increase in right ventricular systolic pressure (RVSP) after 21 days (Fig. 1A). Cardiac output (CO) was reduced in MCT rats at day 21 (Fig. 1B). Pulmonary vascular resistance (PVR) obtained by calculating the ratio of RVSP/CO was significantly increased in MCT rats (Fig. 1C). The diseased animals developed marked right ventricular hypertrophy, as evidenced by the increased Fulton index, measured by the ratio in weight, of right to left ventricle + septum (Fig. 1D). In addition, MCT animals showed arterial wall remodeling with muscularization of the small arteries and thickening of the pulmonary artery walls (Fig. 1E, F and G).

Difference in bacterial composition between control and MCT rats in gut and lung microbiota samples

The median number of sequences per sample was 203,544 (IQR: 160,277-263,426) and 177,911 (IQR: 126,286-283,851) for BAL and lung samples, respectively. Gut libraries have 366,056 (IQR: 327,942- 401,357) median sequences. Libraries were reduced to 14,414 (IQR: 6,036-17,836) and 12,319 (IQR: 7,510-22,534) median sequences for BAL and lung samples, respectively. Median sequences for gut libraries after decontamination were 35,479 (IQR: 33,316-46,073). Final OTU number after decontamination was 244 for gut samples and 356 for lung and BAL samples together.

Phyla composition analysis showed that Firmicutes, Bacteroidota and Proteobacteria were the 3 dominant phyla in the gut microbiota of control and MCT rats (Fig. 2A1 and 2B1). In the lung microbiota, the bacterial composition was dominated by 4 phyla in control and MCT rats. These were Firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteriota and Proteobacteria (Fig. 2A2, 2B2, 2A3 and 2B3). Some bacteria such as Actinobacteriota are present only in the lung. The proportion of Bacteroidota is very low in the lung compared to the gut in control rats. Proteobacteria are also more abundant in the lung than in the gut. In the gut microbiota, we observed a higher relative abundance (RA) of Firmicutes in MCT rats (Fig. 2B1) whereas the RA of Bacteroidota was higher in control rats (Fig. 2B1). In the BAL microbiota, the RA of Actinobacteriota was higher in MCT rats (Fig. 2A2 and 2B2) compared to control rats. Finally, in the lung parenchyma, the RA of Proteobacteria and Actinobacteriota were higher in control rats, whereas the RA of Bacteroidota was higher in MCT rats (Fig. 2A3 and 2B3).

No difference in bacterial diversity between control and MCT rats in gut and lung microbiota

The richness of the three sampling sites (measured by the Chao-1 index) was identical between control and MCT rats (Fig. 3A), The α -diversity was analyzed using the Shannon (Fig. 3B) and Simpson (Fig. 3C) indices. Likely, no significant differences between control and MCT rats was observed regardless of sampling site.

MCT and control rats clustered together in multidimensional analysis of their microbiota regardless of the site analyzed.

Our objective was to compare the composition of the bacterial communities of each of the three sites and to see if the distribution of the bacterial communities was specific to each site. We used principal component analysis (PCA) to visualize the relationships between bacterial communities at each site (Fig. 4A) and to test whether significant amounts of variation can be explained by differences between sampling sites according to the rat's group (control vs. MCT). First of all, unsupervised multivariate analysis (PCA) on clr-transformed showed a clear separation between the two niches (gut vs. lung, Fig. 4 X-axis), which was expected given that the microbiota of these two sites is known to be different. Interestingly, two bacterial airway community subtypes were revealed according to the sampling method (lavage vs lung parenchyma, Fig. 4 Y-axis). Overall, no difference was observed in the beta-diversity between the groups of rats (control vs. MCT). All three types of microbiota share bacterial families belonging to the four phyla described above in Fig. 2: Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria and Actinobacteriota. Families belonging to the phylum Firmicutes are the most abundant in all three sample sites (Fig. 4B). Supervised multivariate analysis on the clr-transformed gut matrix showed a clear separation between control and MCT rats (fig. 5A1). Interestingly, the gut microbiome of control rats was characterized by families from different phyla, whereas the gut microbiome of MCT rats was dominated by families that all belong to the phylum Firmicutes (Fig. 5A2).

This high proportion of Firmicutes in the gut microbiota of MCT rats contributes to the gut dysbiosis. Indeed, the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes was higher in the gut microbiota of MCT rats (Fig. 6), which is considered to be a characteristic of gut dysbiosis as described previously ²⁰. The MCT group (represented by the orange dots in Fig. 5A1) was strongly correlated with three bacterial families: *Monoglobaceae*, *Oscillospiraceae* and *Clostridiaceae* (Fig. 5A2).

Supervised multivariate analysis on the clr-transformed BAL microbiota matrix, the PCA separated the control rats from the MCT rats on the X-axis which corresponds to about 20% of the explanatory variance (Fig. 5B1). The superposition of the two graphs (Fig. 5B1 and Fig. 5B2) shows a positive correlation between MCT rats and *Bifidobacteriaceae* (Actinobacteriota).

In the supervised multivariate analysis on the clr-transformed data from the lung tissue microbiota, PCA separated control from diseased rats on the x-axis with an explanatory variance of approximately 17% (Fig. 5C1). Overlaying the two graphs (Fig. 5C1 and Fig. 5C2) shows a positive correlation between control rats and *Lachnospiraceae* as well as *Pseudomonaceae*. As for the MCT rats, they are correlated with *Corynebacteriaceae*.

Divergent bacterial taxons between control and MCT rats at different sampling sites

The linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) method revealed significant differences between control and MCT rats in both gut and BAL microbiota (Fig. 7). In the gut microbiota, *Oscillospiraceae*, *Oscillospirales*, *Oscillibacter* and *Lachnospiraceae_NK4B4* are significantly increased in PH rats (Fig. 7A). In the BAL, we found an increase in Actinobacteriota in PH rats, but this was not significant (Fig. 7B).

DISCUSSION

In this study, we aimed to decipher how the gut and lower airway microbiota might be altered in the monocrotaline (MCT)-induced rat model of pulmonary hypertension. We chose the MCT model because it better reproduces human PAH in terms of its severity, inflammatory component and its ability to mimic the pulmonary vascular remodeling observed in group 1 patients^{40,41}.

First, we validated our MCT-induced PH model with an increase in RVSP and Fulton index in diseased rats. Cardiac output is collapsed in MCT rats, and this is accompanied by an increase in pulmonary vascular resistance. Vascular remodeling studies have shown an increase in muscularized and obstructed arteries in MCT rats^{42,43}.

Many studies have suggested that gut dysbiosis is involved in several diseases, including respiratory diseases^{44–46}. In our work, we present the first study to compare changes in the gut microbiota with those of the lower respiratory tract microbiota examined by two types of samples, BAL, which mainly explores the bronchial area, and lung biopsies, which mainly explores the alveolar parenchyma compartment that also contains the remodeled small arteries, in the MCT rat model. We found no difference in both α and β diversity in either the gut, BAL or lung parenchyma microbiota according to the two groups of rats (control vs. MCT). In a study performed in another PH model (Sugen/Hypoxia), the authors did not find any significant difference in α and β diversity between control and diseased rats, as did we²⁰. However, another study showed that spontaneously hypertensive rats had lower bacterial load, richness, homogeneity, and diversity than control rats⁴⁷. This could be because PH induction in hypertensive rats is very different from the MCT model. PCA allowed good separation of samples from the gut microbiota and those from the lung microbiota (BAL and lung parenchyma). Within the lung microbiota, PCA was also able to separate samples from the BAL microbiota and the lung parenchyma microbiota.

Considering the microbiota of each niche individually, supervised PCA allowed us to observe a clear separation between the control and MCT group of rats in the gut microbiota. The Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio, recognized as one of the markers of dysbiosis, is higher in the MCT rats in our study. Our results are consistent with those of Callejo who found that this ratio was also increased in sick rats in the Sugan (SU5416) hypoxia model²⁰ and those of Sharma who showed an increase in this ratio in hypertensive rats⁴⁷.

An increase in the F/B ratio, which is due to an emergence of Firmicutes (which is the case in our study) and/or a decrease in Bacteroidetes, has been considered a signature of gut dysbiosis and has been associated with metabolic and cardiovascular diseases^{45,48}. Several studies report an increase in this F/B ratio in human and mouse models and associate this dysbiosis with decreased bacterial loads⁴⁹. This dysbiosis may increase intestinal permeability which may lead to translocation of bacteria and bacterial metabolites into the plasma²⁵. We observed that the gut microbiome of control rats is characterized by families belonging to different phyla (mainly dominated by the phylum Bacteroidetes), whereas that of MCT rats is dominated by families all belonging to the phylum Firmicutes, which also contributed to the increase in the F/B ratio as described above. Our results are consistent with those of other studies showing that Bacteroidetes are enriched in healthy rats and are a feature of a balanced gut.

It is also known that inflammation is a key process in pulmonary vascular remodeling in PAH and its experimental model induced by MCT⁵⁰. It has been shown that intestinal dysbiosis leads to elevated intestinal permeability promoting the development of prostate cancer via the NF- κ B-IL6-STAT3 axis in mice⁵¹. Several studies have shown that the transcription factor NF- κ B contributes to the induction of pulmonary arterial hypertension⁵² with high levels of IL6 detected in PAH patients and its experimental model⁵⁰. Therefore, there may be a pathophysiological link between gut dysbiosis and PAH in human or PH in animals that would involve the upregulation of the NF- κ B-IL6-STAT3 axis, thereby promoting the passage of these pro-inflammatory cytokines to increase their presence in the lung and induce remodeling.

We have also shown that *Monoglobaceae*, *Clostridiaceae* and *Oscillospiraceae* were more abundant in MCT rats' gut microbiota compared to control rats. Likewise, studies have shown that *Clostridium*, was increased in a PH MCT model⁴⁶. Another study has shown that the circulating level of trimethylamine N-oxide (TMAO) is significantly elevated in patients with idiopathic PAH (iPAH)^{53,54} also promoting cardiac enlargement⁵⁵ and cardiac remodeling⁵⁶. Vascular endothelial damage and endothelial dysfunction contribute to the pathogenesis of PAH. TMAO exerts direct endothelial toxicity^{57,58} and induces NO deficiency⁵⁹. This is associated with the fact that TMAO and trimethylamine producing bacteria like *Clostridium* are higher in

PH patients than in healthy controls^{60,61}. The elevated *Clostridium* level in MCT rats could therefore be associated with abnormal production of TMAO, that remains to be investigated in the MCT rat model.

It has been reported that several strains of *Clostridium* induce a pro-inflammatory response in the intestinal mucosa by activating NF- κ B signaling via TLR5⁶². The MCT-induced PH model is known to have a pro-inflammatory component. The emergence of *Clostridium* could therefore induce or contribute to the maintenance of this chronic inflammatory process observed during PH development. There is an imbalance between the TGF β and BMPRII signaling pathways in PAH. This imbalance is due to increased TGF β and decreased BMPRII signaling, resulting in a proliferative phenotype favorable to PAH progression⁶³. Studies have demonstrated significantly higher levels of TGF- β 1 in PAH patients compared with control subjects⁶⁴. *Clostridium* has been shown to exacerbate TGF- β production, thereby promoting the expression of metalloproteinases (MMP2, MMP9, and MMP13) on the surface of colonic intestinal epithelial cells^{65,66}. Metalloproteinases are predictive biomarkers of PAH severity and mortality¹⁴. They also contribute within the lung to pulmonary vascular invasion and remodeling⁶⁷. However, opposite to our results, other studies have shown a decrease in *Clostridium* in PAH in gut⁶⁸, in inflammatory bowel disease (IBD)⁶⁹ and metabolic diseases⁷⁰. This genus being associated with the production of SCFA is generally considered a beneficial bacterial community^{69,70} regulating inflammatory processes⁴⁶ and metabolic disorders⁷¹.

Our results showed an increase in *Oscillospiraceae* in MCT rats. One study indicated that *Oscillospiraceae* is increased in MCT rats, but decreased in hypertensive (angiotensin II (AngII)-induced) rats⁷² and in IBD⁷³. Indeed, a meta-analysis of five studies on the microbiota of IBD patients showed that *Oscillospira* was significantly reduced in Crohn's disease patients. Thus, being negatively correlated with inflammatory diseases and body mass index, *Oscillospira* could be a SCFA-producing bacterium, assuming their protective role in IBD. Furthermore, *Oscillospira* was positively associated with the phenotype of gallstone patients compared to age and sex matched controls⁷⁴. *Oscillospira* is probably a bacterium whose growth is promoted by high bile concentrations and may serve as a biomarker for gallstone formation. It would therefore be interesting to look at the link between MCT-induced PH in rats and high bile conditions, as MCT is a molecule that attacks several organs, including the liver^{75,76}. In another context, male participants with anxiety had a lower relative abundance of bacteria from the *Oscillospiraceae* family compared to those without anxiety symptoms⁷⁷.

The results of the LEfSe analysis also confirmed that, compared to the gut microbiota of control rats, the microbiota of MCT rats was enriched in the order *Monoglobales* and the family *Monoglobaceae*. To our knowledge, no previous study has reported an association between the abundance of *Monoglobales/Monoglobaceae* and pulmonary hypertension. Further studies are therefore needed to understand this increase in *Monoglobales/Monoglobaceae* in MCT rats.

We identified an increase in *Lachnospiraceae* NK4B4 in MCT rats in the gut microbiota. This result is different from those obtained in other studies which have demonstrated a lack of *Lachnospiraceae* in patients with PAH⁶⁸ and heart failure⁷⁸. *Lachnospiraceae* is a bacterium producing SCFAs such as butyrate and propionate, which are protective in cardiovascular diseases and in PH⁷⁹.

Since PCA separates the microbiota from each niche well, we performed the same analyses on the BAL samples. Our results showed an increase in Actinobacteriota in general and in the order *Bifidobacteriales* and family *Bifidobacteriaceae* in PH rats. Similar results were obtained in studies performed in rat PH model^{20,80,81} and in human PAH⁶⁸. However, studies have shown a decrease in *Bifidobacteriales* in heart failure⁷⁸ and in PH⁴⁷.

This study allowed us to show a clear difference between the bacterial communities influenced by PH in the lungs and in the gut. These results support the idea that in addition to the gut-lung axis, there are bacteria nested in the lung that would also influence disease development in rats and that would also be different from the bacteria from the BAL. The observations on the genera identified in this work require further study to better understand their role in PAH.

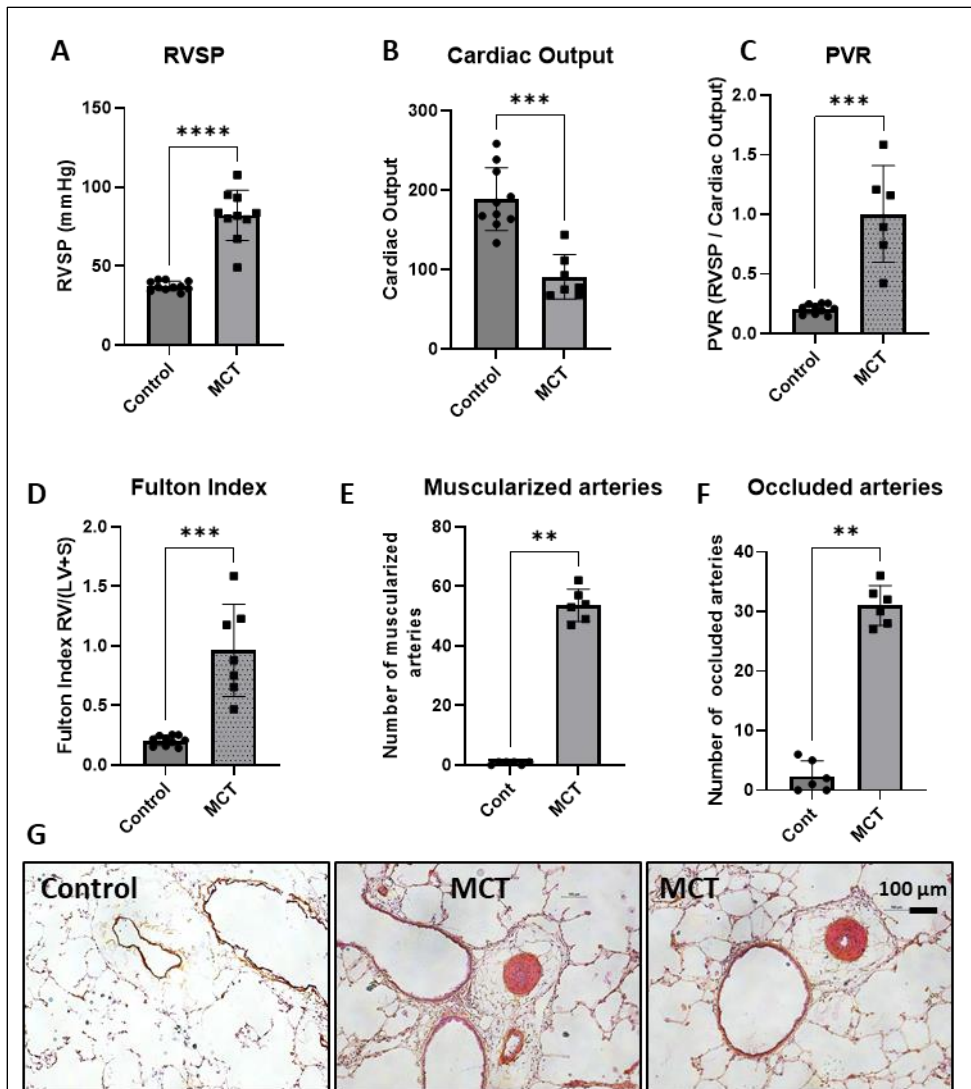


Figure 1. Monocrotaline (MCT)-induced hemodynamic and histological changes.

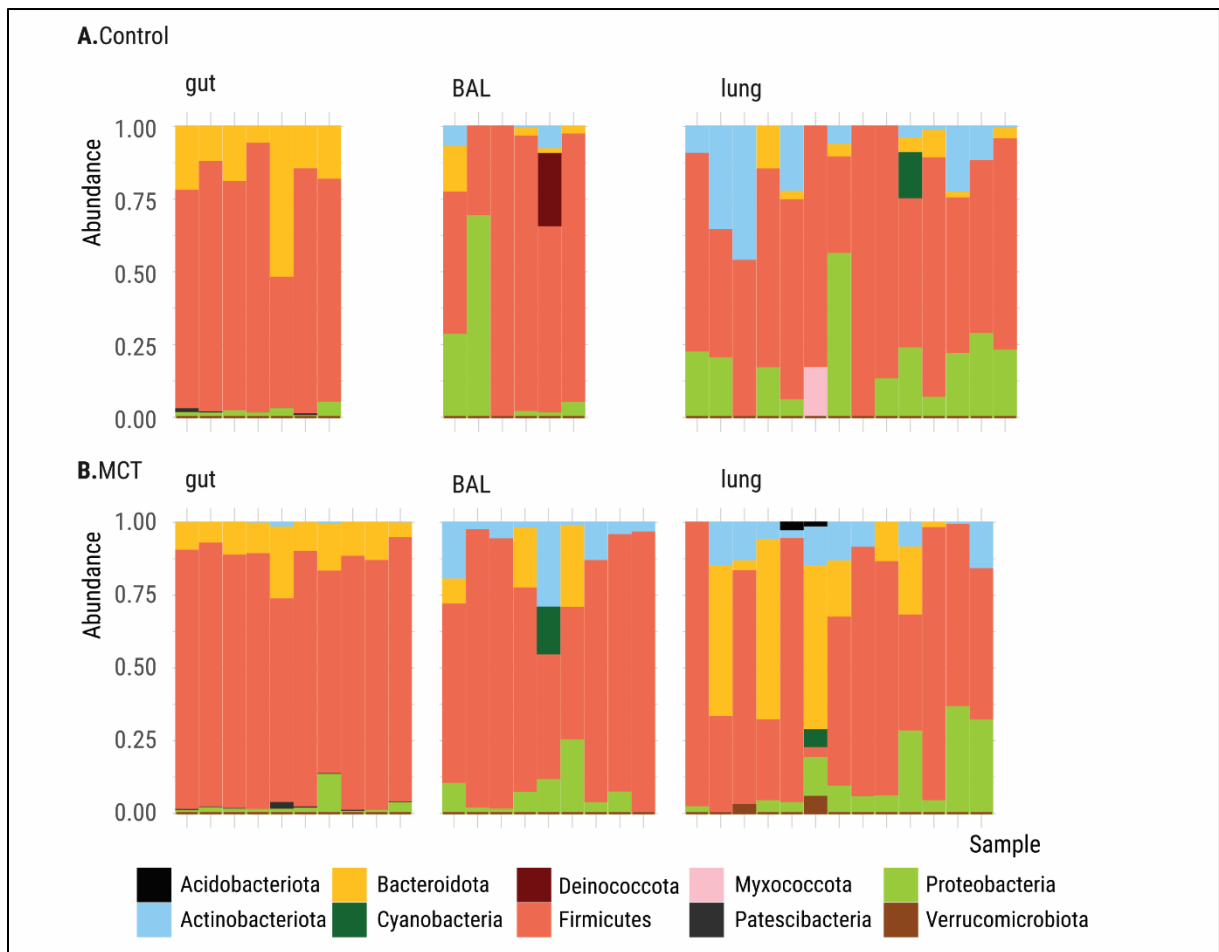


Figure 2. Relative abundance of bacterial phyla.

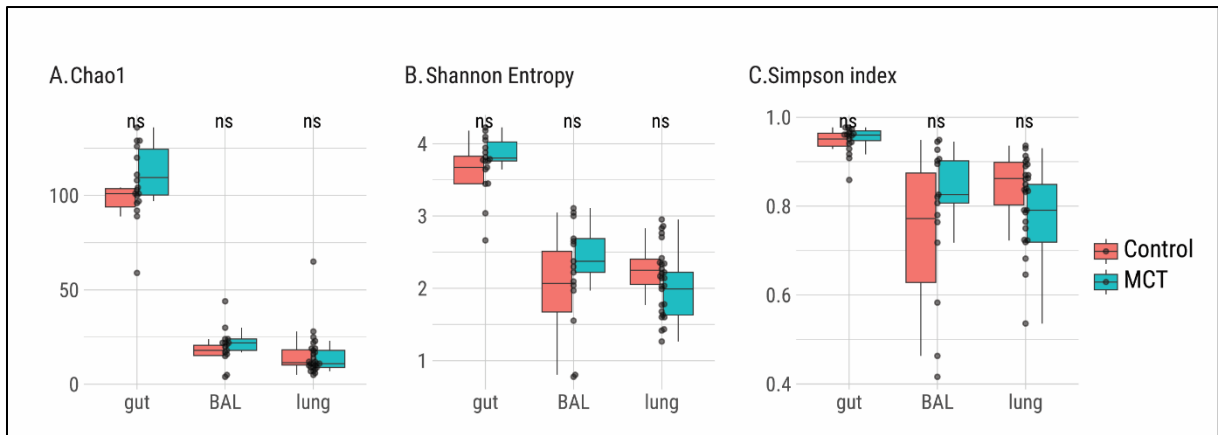


Figure 3. Alpha diversity for both digestive and airway microbiota and for control and MCT rats.

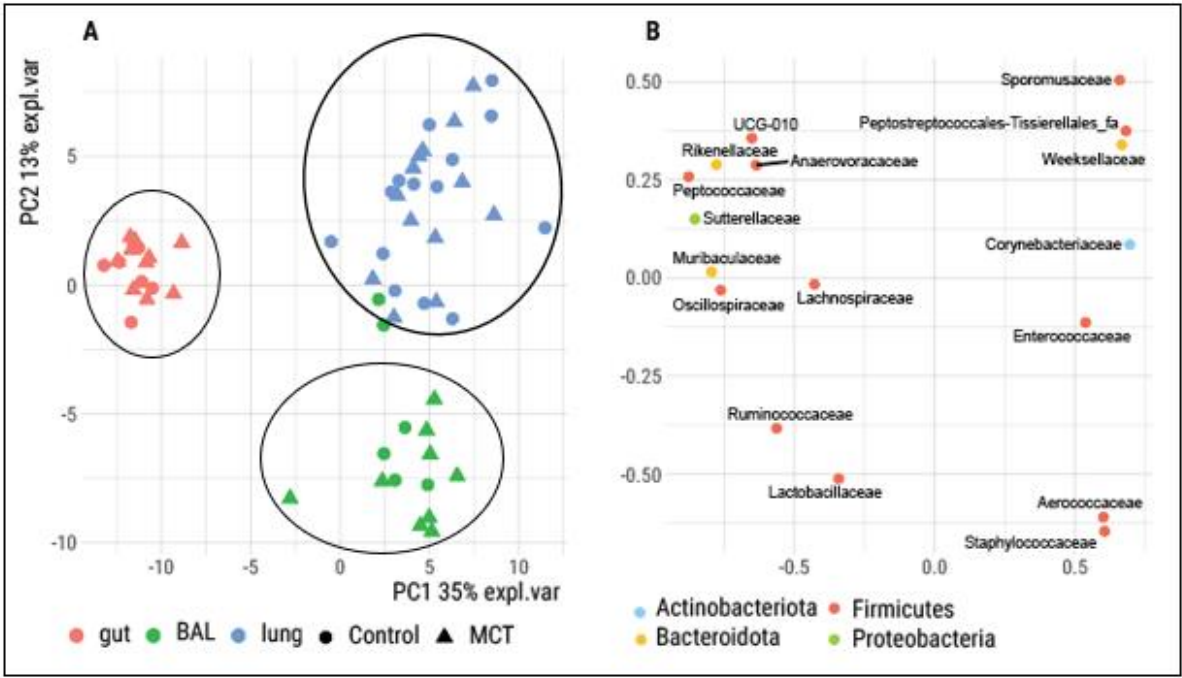


Figure 4. Effects of MCT-induced PH in rats on microbial communities at 3 sampling sites.

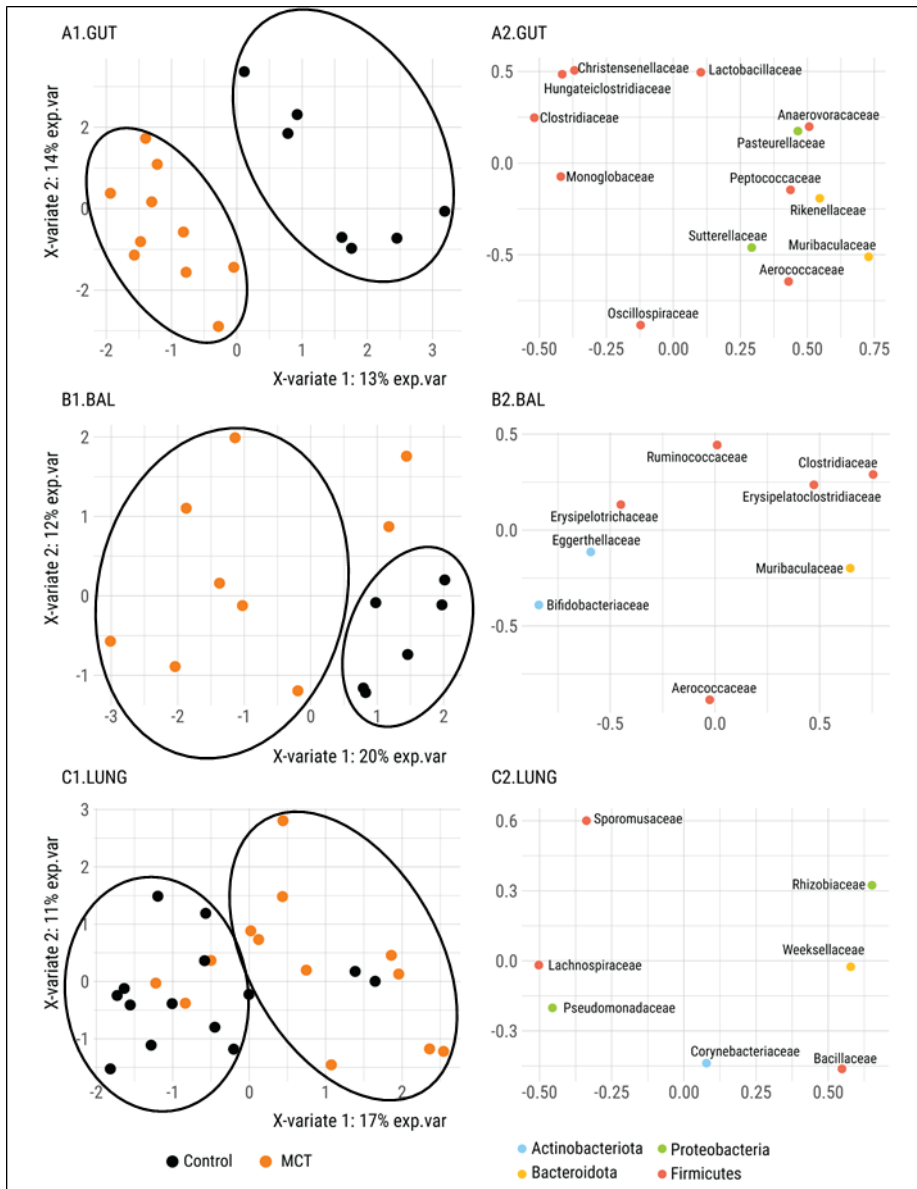


Figure 5. Effects of MCT-induced PH bacterial families in the gut microbiota and the lower respiratory microbiota.

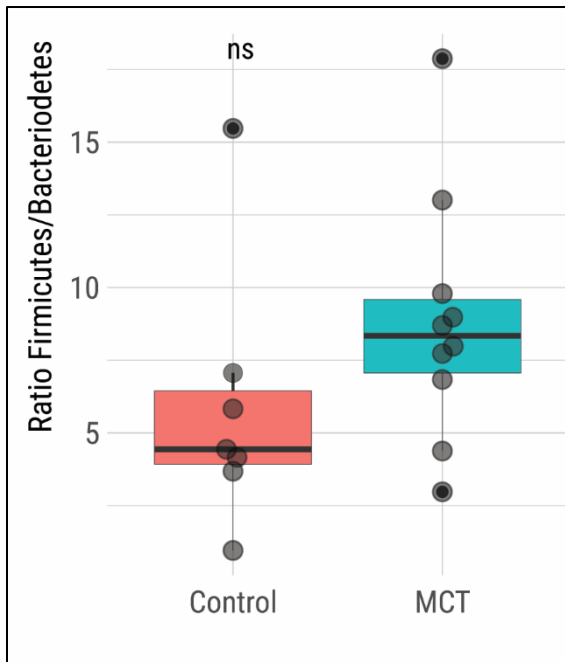


Figure 6. The Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F/B ratio).

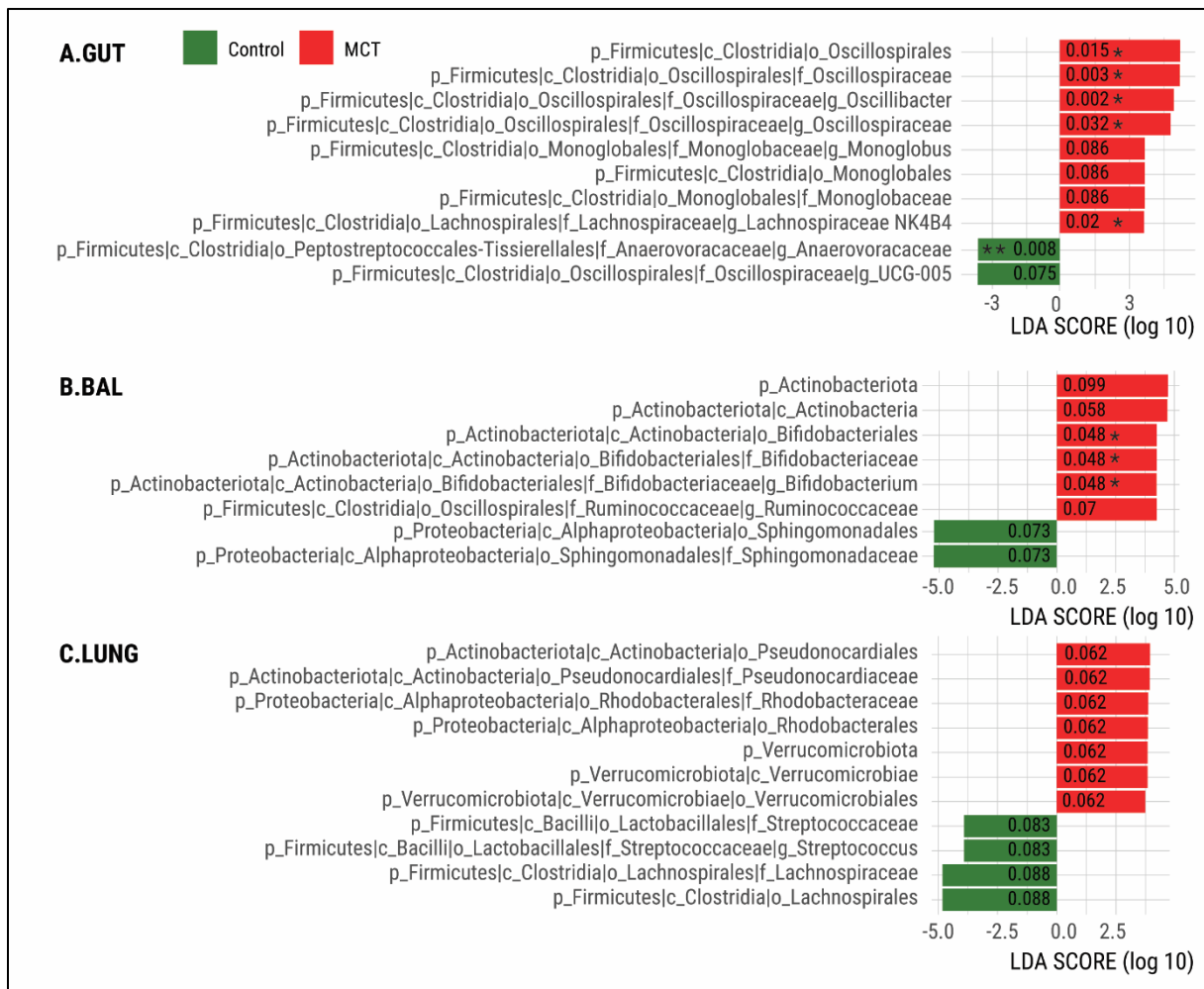


Figure 7. Bacterial genera differentially modulated in MCT induced PH

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Monocrotaline (MCT)-induced hemodynamic and histological changes. (A) Right ventricular systolic pressure (RVSP), (B) Cardiac output (CO), (C) Pulmonary vascular resistance (PVR = RVSP/CO), (D) Fulton index: Weight [VD / (LV+S)], (E) muscularized arteries, (F) Occluded arteries and (G) Hematoxylin-eosin staining of arterial sections (scale bar 100 μ m). We used two-tailed unpaired Student's t-test (Mann-Whitney test) to assess the difference between the two groups. ns = not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

Figure 2: Relative abundance of bacterial phyla. Bacterial 16S rRNA genes were analyzed from fecal, BAL, and lung parenchyma samples to characterize the microbiota of the three sites in MCT and control rats. (A) Bacterial phyla in control rats: (1 = Gut; 2 = BAL; 3 = Lung). (B) Bacterial phyla in MCT rats: (1 = Gut; 2 = BAL; 3 = Lung). (Gut: n = 7 control and 10 MCT; BAL: n = 6 control and 10 MCT; Lung: n = 14 control and 13 MCT).

Figure 3: Alpha diversity for both digestive and airway microbiota and for control and MCT rats. Richness, and α -diversity in control and MCT rats in all three sample types. (A) Chao; (B) Shannon Entropy and (C) Simpson index. n = not significant.

Figure 4: Effects of MCT-induced PH in rats on microbial communities at 3 sampling sites. Bacterial 16S rRNA genes were analyzed from fecal, BAL, and lung parenchyma samples to characterize the different associated microbiomes. a) Principal component analysis (PCA) showed that the gut, BAL and lung parenchyma had significantly distinct bacterial populations. In panel A, each point represents a sample and the distance between points is proportional to the multivariate difference between samples. Samples are colored according to their original group membership (red for feces, blue for lung parenchyma, and green for BAL) and shaped (circle for control and triangle for MCT). Panel B shows the loadings from panel A in the same coordinate space, representing the contributions of ASV (taxonomic level analysis: family) to sample separation. In this plot, each point is an ASV (colored by its assigned taxonomic family), and the distance and direction from the origin to the point representing an ASV is proportional to the standard deviation of that ASV in the data set. The distance between an ASV and another is inversely proportional to their compositional association. Yellow = Bacteroidota; Red = Firmicutes; Blue = Actinobacteriota and Green = Proteobacteria.

Figure 5: Effects of MCT-induced PH bacterial families in the gut microbiota and the lower respiratory microbiota. PLS-DA plot of samples and ASV loads for the original data set of gut microbiota (Fig. 5A), BAL (Fig. 5B), and Lung (Fig. 5C). In panel 1 (Fig. 5A1, Fig. 5B1, and Fig. 5C1), each point is a sample, and the distances between points are proportional to the multivariate difference between samples. The samples are colored according to their rat group (black: control, orange: MCT). Panel 2 (Fig. 5A2, Fig. 5B2, and Fig. 5C2) shows the loadings from panel 1 in the same coordinate space, representing the contributions of VSA (taxonomic level analysis: Family) to sample separation. In this plot, each point is an ASV (colored by its assigned taxonomic phylum), and the distances and direction between the origin and the point representing an ASV are proportional to the standard deviation of that ASV in the data set. The distance between two ASVs is inversely proportional to their compositional association.

Figure 6: Visualization of the Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F/B ratio). The highest F/B ratio in the group monocrotaline (MCT) is a biomarker of gut dysbiosis in rats suffering from PH.

Figure 7: Bacterial genera differentially modulated by MCT induced PH. (A) Bacterial genera differentially modulated by MCT in the gut microbiota. (B) Bacterial genera differentially modulated by MCT in the BAL microbiota. Key phylotypes of differentially abundant taxa were identified using linear discriminant analysis (LDA) combined with an effect size algorithm (LEfSe).

Acknowledgments

We thank Micheline KERGOAT, Michael BONNET and Christelle DELALANDE from Metabrain Research, Les Ulis, France

Conflict of Interest:

Sources of Funding

The LUMI project (Impact of LUng Microbiota in vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension: potential for innovative biotherapeutic target) was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) within ANR-18-CE14-0043 (to S.C-K).

From the French National Institute for the Health and Medical Research (INSERM), the University Paris-Saclay, the Groupe Saint Joseph Marie Lannelongue Hospital and Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569).

REFERENCES

1. Humbert, M. *et al.* 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* **43**, 3618–3731 (2022).
2. Hassoun, P. M. Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **385**, 2361–2376 (2021).
3. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J. & Huffnagle, G. B. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol* **78**, 481–504 (2016).
4. Yu, G. *et al.* Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. *Genome Biol* **17**, 163 (2016).
5. Bassis, C. M. *et al.* Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio* **6**, e00037 (2015).
6. Pattaroni, C. *et al.* Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. *Cell Host Microbe* **24**, 857–865.e4 (2018).
7. Molyneaux, P. L. *et al.* The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 906–913 (2014).
8. Bozinovski, S. *et al.* COPD and squamous cell lung cancer: aberrant inflammation and immunity is the common link. *Br J Pharmacol* **173**, 635–648 (2016).
9. Thorburn, A. N. *et al.* Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun* **6**, 7320 (2015).
10. Tunney, M. M. *et al.* Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* **187**, 1118–1126 (2013).
11. de Oliveira, G. L. V., Oliveira, C. N. S., Pinzan, C. F., de Salis, L. V. V. & Cardoso, C. R. de B. Microbiota Modulation of the Gut-Lung Axis in COVID-19. *Front Immunol* **12**, 635471 (2021).
12. Zhang, C. *et al.* Altered Airway Microbiota Composition in Patients With Pulmonary Hypertension. *Hypertension* **76**, 1589–1599 (2020).
13. Mouraux, S. *et al.* Airway microbiota signals anabolic and catabolic remodeling in the transplanted lung. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 718–729.e7 (2018).
14. Arvidsson, M., Ahmed, A., Säleby, J., Hesselstrand, R. & Rådegran, G. Plasma matrix metalloproteinase 2 is associated with severity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* **12**, e12041 (2022).
15. Segal, L. N. *et al.* Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol* **1**, 16031 (2016).
16. Soon, E. *et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **122**, 920–927 (2010).
17. Le Hiress, M. *et al.* Proinflammatory Signature of the Dysfunctional Endothelium in Pulmonary Hypertension. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor/CD74 Complex. *Am J Respir Crit Care Med* **192**, 983–997 (2015).
18. Trompette, A. *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* **20**, 159–166 (2014).
19. Huang, L., Zhang, H., Liu, Y. & Long, Y. The Role of Gut and Airway Microbiota in Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Microbiol* **13**, 929752 (2022).

20. Callejo, M. *et al.* Pulmonary Arterial Hypertension Affects the Rat Gut Microbiome. *Sci Rep* **8**, 9681 (2018).
21. Malik, M. *et al.* Lactobacillus plantarum 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men With Stable Coronary Artery Disease. *Circ Res* **123**, 1091–1102 (2018).
22. Wedgwood, S. *et al.* The developing gut-lung axis: postnatal growth restriction, intestinal dysbiosis, and pulmonary hypertension in a rodent model. *Pediatr Res* **87**, 472–479 (2020).
23. Robles-Vera, I. *et al.* Antihypertensive Effects of Probiotics. *Curr Hypertens Rep* **19**, 26 (2017).
24. Gómez-Guzmán, M. *et al.* Antihypertensive effects of probiotics Lactobacillus strains in spontaneously hypertensive rats. *Mol Nutr Food Res* **59**, 2326–2336 (2015).
25. Ranchoux, B. *et al.* Gut-Lung Connection in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **56**, 402–405 (2017).
26. Dumas, S. J. *et al.* NMDA-Type Glutamate Receptor Activation Promotes Vascular Remodeling and Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **137**, 2371–2389 (2018).
27. Ribeuz, H. L. *et al.* Involvement of CFTR in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* **58**, (2021).
28. Le Gall, F. *et al.* Proposal of a quantitative PCR-based protocol for an optimal Pseudomonas aeruginosa detection in patients with cystic fibrosis. *BMC Microbiol* **13**, 143 (2013).
29. Babraham Bioinformatics - FastQC Un outil de contrôle qualité pour les données de séquence à haut débit. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
30. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Käller, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **32**, 3047–3048 (2016).
31. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12 (2011).
32. BBMap Guide. *DOE Joint Genome Institute* <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbmap-guide/>.
33. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* **13**, 581–583 (2016).
34. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**, D590–D596 (2013).
35. Olesen, S. W., Duvall, C. & Alm, E. J. dbOTU3: A new implementation of distribution-based OTU calling. *PLOS ONE* **12**, e0176335 (2017).
36. Balaban, M., Moshiri, N., Mai, U., Jia, X. & Mirarab, S. TreeCluster: Clustering biological sequences using phylogenetic trees. *PLOS ONE* **14**, e0221068 (2019).
37. Janssen, S. *et al.* Phylogenetic Placement of Exact Amplicon Sequences Improves Associations with Clinical Information. *mSystems* **3**, e00021-18 (2018).
38. McKnight, D. T. *et al.* microDecon: A highly accurate read-subtraction tool for the post-sequencing removal of contamination in metabarcoding studies. *Environmental DNA* **1**, 14–25 (2019).
39. Chao, A. *et al.* Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* **84**, 45–67 (2014).

40. Pak, O. *et al.* Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Drug Discovery Today: Disease Models* **7**, 89–97 (2010).
41. de Jesus Perez, V. A. Molecular pathogenesis and current pathology of pulmonary hypertension. *Heart Fail Rev* **21**, 239–257 (2016).
42. Savale, L. *et al.* Serum and pulmonary uric acid in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* **58**, (2021).
43. Le Ribeuz, H. *et al.* Involvement of SUR2/Kir6.1 channel in the physiopathology of pulmonary arterial hypertension. *Front Cardiovasc Med* **9**, 1066047 (2022).
44. Howitt, M. R. & Garrett, W. S. A complex microworld in the gut: gut microbiota and cardiovascular disease connectivity. *Nat Med* **18**, 1188–1189 (2012).
45. Sanz, Y. & Moya-Pérez, A. Microbiota, inflammation and obesity. *Adv Exp Med Biol* **817**, 291–317 (2014).
46. Thenappan, T., Khoruts, A., Chen, Y. & Weir, E. K. Can intestinal microbiota and circulating microbial products contribute to pulmonary arterial hypertension? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **317**, H1093–H1101 (2019).
47. Sharma, R. K. *et al.* Pulmonary arterial hypertension-associated changes in gut pathology and microbiota. *ERJ Open Res* **6**, 00253–02019 (2020).
48. Everard, A. & Cani, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **27**, 73–83 (2013).
49. Leclercq, S. *et al.* Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4485–4493 (2014).
50. Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **22**, 358–363 (2003).
51. Zhong, W. *et al.* Gut dysbiosis promotes prostate cancer progression and docetaxel resistance via activating NF- κ B-IL6-STAT3 axis. *Microbiome* **10**, 94 (2022).
52. Fan, J. *et al.* Upregulation of miR-335-3p by NF- κ B Transcriptional Regulation Contributes to the Induction of Pulmonary Arterial Hypertension via APJ during Hypoxia. *Int J Biol Sci* **16**, 515–528 (2020).
53. Huang, Y. *et al.* Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide Aggravates Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **66**, 452–460 (2022).
54. Yang, Y. *et al.* Higher circulating Trimethylamine N-oxide levels are associated with worse severity and prognosis in pulmonary hypertension: a cohort study. *Respir Res* **23**, 344 (2022).
55. Li, Z. *et al.* Gut microbe-derived metabolite trimethylamine N-oxide induces cardiac hypertrophy and fibrosis. *Lab Invest* **99**, 346–357 (2019).
56. Yang, W. *et al.* Gut microbe-derived metabolite trimethylamine N-oxide accelerates fibroblast-myofibroblast differentiation and induces cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* **134**, 119–130 (2019).
57. Li, T., Chen, Y., Gua, C. & Li, X. Elevated Circulating Trimethylamine N-Oxide Levels Contribute to Endothelial Dysfunction in Aged Rats through Vascular Inflammation and Oxidative Stress. *Front Physiol* **8**, 350 (2017).
58. Boini, K. M., Hussain, T., Li, P.-L. & Koka, S. Trimethylamine-N-Oxide Instigates NLRP3 Inflammasome Activation and Endothelial Dysfunction. *Cell Physiol Biochem* **44**, 152–162 (2017).

59. Brunt, V. E. *et al.* Trimethylamine-N-Oxide Promotes Age-Related Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Mice and Healthy Humans. *Hypertension* **76**, 101–112 (2020).
60. Koeth, R. A. *et al.* Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* **19**, 576–585 (2013).
61. Chen, M. *et al.* Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. *mBio* **7**, e02210-02215 (2016).
62. Batah, J. *et al.* Clostridium difficile flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins. *Sci Rep* **7**, 3256 (2017).
63. Tielemans, B., Delcroix, M., Belge, C. & Quarck, R. TGF β and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discovery Today* **24**, 703–716 (2019).
64. Selimovic, N. *et al.* Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* **34**, 662–668 (2009).
65. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
66. Bauché, D. & Marie, J. C. Transforming growth factor β : a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clin Transl Immunology* **6**, e136 (2017).
67. Akter, H. *et al.* Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by neurotensin promotes cell invasion and migration through ERK pathway in gastric cancer. *Tumour Biol* **36**, 6053–6062 (2015).
68. Kim, S. *et al.* Altered Gut Microbiome Profile in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension* **75**, 1063–1071 (2020).
69. Matsuoka, K. & Kanai, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* **37**, 47–55 (2015).
70. Clarke, S. F. *et al.* The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes* **3**, 186–202 (2012).
71. van Deuren, T., Blaak, E. E. & Canfora, E. E. Butyrate to combat obesity and obesity-associated metabolic disorders: Current status and future implications for therapeutic use. *Obes Rev* **23**, e13498 (2022).
72. Sharma, R. K. *et al.* Pulmonary arterial hypertension-associated changes in gut pathology and microbiota. *ERJ Open Res* **6**, 00253–02019 (2020).
73. Walters, W. A., Xu, Z. & Knight, R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters* **588**, 4223–4233 (2014).
74. Keren, N. *et al.* Interactions between the intestinal microbiota and bile acids in gallstones patients. *Environmental Microbiology Reports* **7**, 874–880 (2015).
75. Otaka, F. *et al.* Macrophages contribute to liver repair after monocrotaline-induced liver injury via SDF-1/CXCR4. *Exp Ther Med* **22**, 668 (2021).
76. Cao, Y. *et al.* Kupffer cells play a crucial role in monocrotaline-induced liver injury by producing TNF- α . *Toxicology* **468**, 153101 (2022).
77. Kim, S.-Y. *et al.* Association between gut microbiota and anxiety symptoms: A large population-based study examining sex differences. *Journal of Affective Disorders* (2023) doi:10.1016/j.jad.2023.04.003.

78. Krummen, M. *et al.* Gut Microbiota Signature in Heart Failure Defined From Profiling of 2 Independent Cohorts. *Journal of the American College of Cardiology* **71**, 1184–1186 (2018).
79. Zhang, J. *et al.* Beneficial effect of butyrate-producing Lachnospiraceae on stress-induced visceral hypersensitivity in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **34**, 1368–1376 (2019).
80. Sanada, T. J. *et al.* Gut microbiota modification suppresses the development of pulmonary arterial hypertension in an SU5416/hypoxia rat model. *Pulm Circ* **10**, 2045894020929147 (2020).
81. Hong, W. *et al.* Changes in the gut microbiome and metabolome in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Bioengineered* **12**, 5173–5183 (2021).

Butyrate, a bacterial metabolite modulates vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension.

Kouamé Firmin AKOUMIA^{1,2}, Lucille PENALVA MOUSSET^{1,2}, Julien GRYNBLAT^{1,2}, Florent DUMONT^{1,2}, Fabrice ANTIGNY^{1,2}, Maria Rosa GHINIA^{1,2,7}, Elie FADEL^{1,2}, Geneviève HERY-ARNAUD⁵, Nicolas LAPAQUE³, David MONTANI^{1,2,4}, Marc HUMBERT^{1,2,4}, Frédéric PERROS^{1,2}, Sylvia COHEN-KAMINSKY^{1,2}

1. INSERM UMR_S 999 « Hypertension Pulmonaire Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.
2. Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, France.
3. Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Univ. Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France
4. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.
5. Inserm UMR 1078, Université de Bretagne Occidentale, UFR de Médecine, Brest, France
6. Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France.
7. Department of Pathology, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis-Robinson, France.

*These authors contributed equally to the work

Corresponding author: Sylvia Cohen-Kaminsky, INSERM UMR_S999, Hôpital Marie Lannelongue, 133 Avenue de la Résistance, F92350 Le Plessis Robinson, France. sylvia.cohen-kaminsky@universite-paris-saclay.fr

Statut de l'article : En préparation pour la soumission

ABBREVIATIONS

CO: Cardiac output

ECM: Extracellular matrix

HDAC: Histone deacetylase

iPAH: idiopathic PAH

MCT: Monocrotalin

mPAP: mean pulmonary arterial pressure.

NaBu: Sodium butyrate

PAEC: Pulmonary arterial endothelial cell

PAH: Pulmonary arterial hypertension

PASMC: Pulmonary arterial smooth muscle cell

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PH: Pulmonary hypertension.

PVOD: Pulmonary veno occlusive disease.

PVR: pulmonary vascular resistance.

RVSP: Right ventricular systolic pressure

SCFA: Short-chain fatty acids

TNF: Tumor necrosis factor

ER: Endoplasmic reticulum

MMP: Metalloproteinase

CHOP or DDIT3: DNA Damage Inducible Transcript 3

BMPRII: Bone morphogenetic protein receptor type II

GPR: G protein-coupled receptors

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

ERK: extracellular signal-regulated kinases

IL: Interleukin

NF-kappaB: nuclear factor-kappa B

Cox: Cyclo-oxygenase

ATF4: Activating Transcription Factor 4

Xbp-1: X-box binding protein 1

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DEG: Differentially expressed genes

ECM: Extracellular matrix

CDK: cyclin-dependent kinases

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and incurable disease characterized by lung vascular remodeling, a progressive and exaggerated obstruction of the small-caliber pulmonary arteries. Non-curative treatments exist to improve the daily lives of patients. However, all target endothelial cell dysfunction and act mainly as vasodilators, and none of them consider the role of the microbiota and its metabolites in this disease. Butyrate, a short-chain fatty acid (SCFA) produced primarily by gut microbial fermentation, is a histone deacetylase (HDAC) inhibitor thought to have a protective effect in inflammatory bowel disease. Its role in PAH or models of pulmonary hypertension (PH) is not yet known. Here, we tested the hypothesis that butyrate is protective in PAH and a monocrotaline rat model of PH. First, we assessed the expression of SCFA receptors in the lung, pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), and pulmonary artery endothelial cells (PAECs) from controls and PAH patients. In vitro, in PASMCs, sodium butyrate (NaBu) inhibited PDGF-induced proliferation and migration and TNF-alpha-induced inflammation. In vessels isolated from control rats, NaBu induced relaxation in pulmonary arteries after induction of contraction with U46619. In vivo, we used Wistar rats induced for pulmonary hypertension using monocrotaline. Treatment with 400 mg/kg/day NaBu for 21 days improved hemodynamic parameters by preventing MCT-induced right ventricular hypertrophy, increased right ventricular systolic pressure (RVSP), pulmonary vascular resistance (PVR), and pulmonary vascular remodeling. NaBu treatment also reduced inflammation with a decrease in Cox2 and IL-6 expression. NaBu inhibited endoplasmic reticulum stress (ER stress) and cell invasion by decreasing protein expression of Chop and MMP-2. Transcriptome (RNAseq) studies in the MCT model revealed a set of genes that are negatively or positively regulated by NaBu.

These results provide evidence that butyrate may play a protective role in vascular remodeling leading to PAH, suggesting its use as a new treatment of PAH.

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease of the small pulmonary vessels characterized by an increase in the mean pulmonary artery pressure (mPAP), leading to increased pulmonary vascular resistance (PVR), inevitably leading to right heart failure and death. It is a form of pre-capillary pulmonary hypertension (PH) defined at right heart catheterization by mPAP > 20 mmHg, PVR > 2 Wood units, and pulmonary arterial wedge pressure \leq 15 mmHg¹. Abnormal accumulation of smooth muscle and endothelial cell (SMC, EC) dysfunction, entangling the vascular obstruction are hallmarks of pulmonary vascular remodeling observed in the pulmonary arteries of PAH patients and experimental models of PAH. Complex vascular lesions follow excessive proliferation, migration, and proinflammatory activation of adventitial fibroblasts^{2,3}. Several mutations associated with PAH may contribute to PAH pathophysiology⁴. Among them, *BMPR2* mutations are the most frequent and associated with an increase in the thickness of the vascular intima⁵, directly affecting the secretion of vasodilating and inflammatory cytokines by endothelial cells⁶. They also contribute to medial hypertrophy and signaling changes that increase migration, proliferation, and cytokine release from SMCs^{7,8} and to the proliferation and differentiation of adventitia fibroblasts into myofibroblasts, thereby contributing to extracellular matrix production in vascular remodeling⁹.

The microbiome is formed by an ecosystem considering all the microorganisms in a particular environment and their genes and interactions¹⁰. New high-throughput sequencing technologies provide essential information on the composition and richness of the microbiota of several human organs. Using axenic animals (germ-free) provides knowledge of the pulmonary microbiota and its involvement in many cardiovascular diseases through bacterial metabolites. Studies indicate the existence of an alteration in the composition of the microbiota and dysbiosis and their association with the development and exacerbation of certain lung respiratory diseases^{11,12}.

Butyrate, a short-chain fatty acid, is produced by the intestinal microbial fermentation of dietary carbohydrates, fibers, proteins, and peptides. Butyrate is an inhibitor of class I and II HDACs but not class III¹³. Due to its antiproliferative, anti-inflammatory, and metabolic functions, butyrate is considered protective in many cardiovascular and inflammatory bowel diseases¹⁴. Studies on SMCs have demonstrated that butyrate inhibits cell proliferation by regulating gene expression of signaling pathways involved in cell cycle progression¹⁵. Diagnosing and managing PAH are not yet considering the pulmonary microbiota and its bacterial metabolites. In this context, butyrate is an excellent candidate because of its HDAC-like effects^{16,17}. Studies

have reported elevated protein levels of HDAC1 and HDAC5 in patients with idiopathic PAH and experimental models of pulmonary hypertension¹⁸. HDAC inhibitors can suppress hypoxia-induced cardiopulmonary remodeling in rats via antiproliferative mechanisms on vascular cells.^{19,20} Here, we aimed to evaluate the importance of butyrate and its dysregulation in vascular remodeling leading to PAH.

RESULTS

Butyrate and its receptors are dysregulated in the lung and vascular cells of iPAH patients

GPR41, GPR43 and GPR109A are the main known short chain fatty acid receptors in the gut²¹. We performed western blots and qPCR using protein and RNA to assess the expression of the short-chain fatty acid receptors GPR41, GPR43 and GPR109A in lung tissue and pulmonary vascular cells from control and iPAH patients (Fig. 1). We found that GPR41 and GPR43 receptor proteins and messenger RNAs were significantly decreased in patients with iPAH (Fig. 1A, B and C), whereas GPR109A receptor gene expression did not differ between control and iPAH patients (*Supplementary Fig. 1A*). GPR43 protein expression was significantly higher in pulmonary artery endothelial cells (PAECs) of iPAH patients compared to controls, while this was not the case for GPR41 (*Supplementary Fig. 1B*). GPR41 and GPR43 protein expression was increased in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from patients with iPAH compared to control subjects, but did not reach statistical significance (*Supplementary Fig. 1C*).

NaBu reduced spontaneous and PDGF-induced proliferation in PASMC controls. PDGF is a PASMC growth factor overproduced in PAH and involved in vascular remodeling²¹. Butyrate accelerates epithelial proliferation and increases crypt cell production rate in rat intestines^{22,23}. We, therefore, investigated the potential cross-talk of PDGF-BB and butyrate pathways and the potential of butyrate to inhibit PDGF-dependent hPASMC proliferation. The cell viability assay based on the reduction of a tetrazolium compound (MTS) and the Bromodeoxyuridine (BrdU) assay for proliferation assessment revealed that NaBu inhibits the PDGF-induced increase in hPASMC viability and proliferation in a dose-dependent manner (Fig. 2A and 2B), allowing to determine NaBu 5nM as an optimal concentration for subsequent experiments. We further confirmed this proliferation inhibitory effect of NaBu using the iCELLigence system for real-time electrical impedance detection of cell proliferation (Fig. 2C). Thus, we monitored the electrical impedance under the cells in hPASMC cultures exposed or not to PDGF (20 ng/ml) for 96 h, with or without NaBu (5 mM). PDGF-exposed cells showed

an increase in impedance compared with control cells. NaBu decreased the impedance of cells exposed or not to PDGF, meaning that NaBu can inhibit both spontaneous and PDGF-dependent proliferation. Ki-67 positive labeling by immunofluorescence analysis also confirmed these results. Spontaneous proliferating hPASMC showed high Ki-67 expression, while 24 hours of exposure to 5 mM NaBu significantly decreased the Ki-67 positive cells (Fig. 2D).

Protein expression analysis showed that NaBu acted at the transcriptional level in PASMC proliferation, decreasing or increasing the gene expression of important positive or negative cell cycle regulators. After 24 h, NaBu reduced the expression of the phosphorylated form of the survival protein Akt in PASMC exposed to PDGF (Fig. 2E). In the same cell cultures, the protein expression of the negative cell cycle regulators p21 and p27 increased significantly, suggesting cell cycle arrest (Fig. 2E). The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression level was also significantly decreased in NaBu-exposed cells for 24 h (Fig. 2F). Finally, NaBu significantly reduced the expression of the phosphorylated form of Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) after 4 h exposure (Fig. 2F).

NaBu inhibits PDGF-induced migration and TNF alpha-induced inflammation in PASMCs.

In PAH, cell migration is an essential mechanism that usually precedes cell proliferation. To assess the impact of NaBu in this process, we induced migration of PASMCs with PDGF (20 ng/ml) and exposed them or not to NaBu (5 mM). To evaluate migration, we blocked cell proliferation, using Cytosine D-arabinoase (1 μ l/ml) for 24 h. NaBu significantly inhibited PDGF-induced hPASMC migration after 24 h (Fig. 2G).

Inflammation is a necessary mechanism underlying pulmonary vascular remodeling. To assess the role of NaBu in this process, we pre-incubated PASMCs with NaBu for 24 h and then exposed them to TNF- α for 30 min or 24 h with or without NaBu. We analyzed the protein expression of typical inflammation markers. We show that NaBu reduced TNF- α -induced inflammation by inhibiting the protein expression of IL-1 β and phospho NF-kappaB (Fig. 2H).

NaBu treatment *in vivo* impacts the development of MCT-induced PH.

Given the results obtained *in vitro* in PASMCs, we studied the impact of NaBu in the animal model of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension in rats to better understand how this exclusive bacterial metabolite that humans cannot produce, regulates the known

mechanisms of PH. We chose the MCT model considering the cellular mechanisms regulated by NaBu in PASMC. Indeed, butyrate is an anti-inflammatory metabolite and an inhibitor of HDAC and, therefore, cell proliferation²⁴⁻²⁶. The MCT model is also known for its inflammatory component²⁷ and recapitulates PAH in many aspects²⁸. PH was induced in rats by a single subcutaneous injection of 60 mg/kg at D0. We administered by the intraperitoneal route a dose of 400 mg/kg/day NaBu to the rats from D0 to D21 (Fig. 3A). We excluded the per-os route to avoid artifacts in dosing due to intestinal consumption of NaBu.

In NaBu-treated rats, we noted an improvement in right ventricular systolic pressure (RVSP) (Fig. 3B), cardiac output (CO) (Fig. 3C), pulmonary vascular resistance (PVR) assessed by calculating the RVSP/CO ratio (Fig. 3D) and right ventricular hypertrophy (evaluated by the Fulton index values) (Fig. 3E) compared to MCT rats receiving vehicle (NaCl). As expected animals induced for PH showed arterial wall remodeling with increased muscularity of small caliber arteries with increased wall thickness. Preventive treatment with NaBu reduced vessel wall thickening and neo-muscularisation capacity of small pulmonary vessels. Indeed NaBu-treated rats presented a significantly reduced number of muscularized vessels (Fig. 3F). All together, these results demonstrate that NaBu treatment reduces the development of PH in MCT rats.

NaBu attenuates PH by regulating several mechanisms

In inflammatory bowel disease, sodium butyrate significantly improves the inflammatory response and intestinal epithelial barrier dysfunction, in mice²⁹. There is clear evidence that inflammatory cells contribute to pulmonary vascular remodeling in PAH³⁰. To assess the anti-inflammatory effects of NaBu, we performed a Western blot analysis of rat total lung lysates using an anti-Cox-2 antibody (Fig. 4A) and quantified IL6 gene expression by qPCR (Fig. 4B). The results show that NaBu inhibited Cox-2 protein expression and IL-6 gene expression. We then assessed the effects of NaBu in the ER stress.

ER stress is involved in PAH and contributes to the development of MCT-induced PH in rats³¹ and deleting Xbp-1 results in improved hemodynamic parameters and attenuates pulmonary vascular remodeling³². To assess the impact of NaBu on ER stress, we examined the protein expression of Chop encoded by the *DDIT3* gene and *ATF4*, two transcription factors essential in endoplasmic reticulum stress, by Western blot. Our results show an increase in the expression of Chop and ATF4 in MCT rats, which was reduced significantly in NaBu-treated rats (Fig. 4C).

Sodium butyrate inhibits invasion and migration by reducing matrix metalloproteinases.

Studies have shown that high plasma levels of MMP-2 correlate with poor prognosis in human PAH³³ It is also described that activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promotes cell invasion and migration in gastric cancer³⁴. To assess the ability of NaBu to inhibit cell invasion and migration, we analyzed the protein profile of MMP-2 by Western blot in total lung extracts of MCT and NaBu-treated rats. NaBu significantly reduced MMP-2 expression compared to untreated rats (Fig. 4D), thus confirming *in vivo* its impact on cell migration.

Butyrate induces the relaxation of rat pulmonary arteries and PASMC.

We assessed the ability of NaBu to induce relaxation in pulmonary arteries (PA) of control rats. We precontracted PAs using 1 $\mu\text{mol/L}$ U46619, a thromboxane A2 mimetic, and then exposed them or not to NaBu (5mM) We found that NaBu induced PA relaxation of precontracted PAs compared to PAs treated with the vehicle DMSO (Fig. 4E). These results show that NaBu has vasodilatory properties in addition to antiproliferative and anti-inflammatory effects.

RNAseq results and genes regulated by NaBu treatment.

We conducted an RNAseq transcriptomic study to better understand the signaling pathways and mechanisms by which butyrate attenuates PH in the MCT rat model. The results of the principal component analysis (PCA) showed significant variation in transcripts between control, MCT (diseased) and NaBu-treated MCT rats, with a total variance of 67% on the Y-axis, separating controls from diseased rats well. The X-axis also separated untreated MCT rats and NaBu-treated MCT rats (Fig. 5A). After processing the data, we identified 17016 transcripts, of which 2476 were differentially expressed between diseased and NaBu-treated MCT rats, when we selected transcript levels of genes that were up- or down-regulated by a change of at least (FC) > 1.1 with statistical significance ($P < 0.05$). Of these 2476 genes, we defined NaBu-regulated genes as genes modulated by TCM (up- or down-regulated) that tended to normalize after NaBu treatment. Analysis of differentially expressed genes (DEGs) revealed 58 genes regulated by NaBu (Fig. 5B). Of these 58 butyrate-modulated genes, 17 were up-regulated (Fig. 5C and *supplementary Fig. 5A*) and 25 were down-regulated (Fig. 5D *supplementary Fig. 5B*) in the NaBu-treated rat. The 16 undescribed genes were unknown in the databases and could not be identified. The enrichment analysis identified the top 50 pathways (Fig. 5E and *supplementary Fig. 5C*) regulated by butyrate, such as IL-17A signaling, B-cell activation, CD27 and TLR signaling, etc. All of the genes were identified in the database. This study also allowed us to identify the top 50 functions (*supplementary Fig. 5H*) regulated by butyrate treatment, such as apoptosis, endothelial progenitor cell differentiation, cell cycle arrest, etc.

DISCUSSION

We used four complementary approaches to determine the importance and effects of NaBu in PAH and PH. First, we looked *in vitro* at the impact of NaBu on crucial mechanisms of PAH. Second, we analyzed *ex vivo* the ability of NaBu to induce relaxation in pre-contracted rat pulmonary arteries. Then, we studied the effects of NaBu in a rat model of PH *in vivo*. Finally, through transcriptome analysis using RNAseq in the lungs of NaBu-treated rats in the MCT-induced PH model, we identified NaBu targets.

Current therapeutic strategies and diagnosis of PAH remain insufficient and risky, respectively, for patients with this pathology. There is still an unacceptable high mortality rate as well as critical functional and hemodynamic impairment in many patients³⁵. Today, many specific treatments approved for PAH that target endothelial cell dysfunction and are mainly vasodilators¹. Although these can slow disease progression and improve the quality of life, they are not curative. Therefore, there is a great need to find new therapies to target pulmonary vascular remodeling in PAH to be used in combination with the current standard of care.

We have shown a decreased SCFA receptor expression in the lung tissue of PAH patients, suggesting a reduced action of SCFA in PAH patients. There is a reduction in circulating SCFA and the relative copy number of gut microbial genes involved in SCFA synthesis (propionate, valerate, butyrate) in PAH patients compared to healthy controls³⁶. However, this study, like most other studies, has limitations in that the assay was not performed at the pulmonary level. HDACi are promising molecules for managing cell growth and differentiation in cancer patients with solid and liquid tumors³⁷. Selective inhibition of class I HDACs suppresses hypoxia-induced cardiopulmonary remodeling through an antiproliferative mechanism³⁸. And HDACi therapy, in combination with sildenafil, has been shown to represent a promising and potentially more effective strategy to target vasoconstriction, metabolic derangement, and pathological vascular remodeling in PH¹⁹. Since butyrate is considered an HDAC inhibitor¹³, our demonstration of the effects of butyrate in experimental PAH makes sense in this context.

Many growth factors are involved in the pathogenesis of PAH. PDGF is increased in PAH patients and regulates several signaling pathways that control pulmonary vascular remodeling through cell proliferation and migration, resistance to apoptosis, and endoplasmic reticulum stress induction³⁹. In this study, we showed that NaBu regulates protein expression of multiple positive and negative proliferation, survival, and cell cycle regulators in PASMCs. NaBu dose-dependently inhibited PASMC proliferation in response to PDGF without altering cell viability. The percentage of Ki-67 positive cells was significantly decreased in NaBu treated PASMC. In

the same vein, we showed that NaBu regulates PDGF-induced cell proliferation and survival by inhibiting the phosphorylation of ERK-1/2 and Akt respectively, and the protein expression of PCNA. Protein expressions of p21 and p27 are increased in NaBu-treated PSMCs involving cell cycle arrest. Interestingly, NaBu also inhibited PDGF-induced migration in PSMCs. These results are consistent with and extend those shown by Cantoni and colleagues, who indicate that butyrate inhibits PDGF-dependent proliferation and migration in PSMCs by mediating acetylation of Akt²⁶. We showed that the expression of p38 phosphorylation was increased in NaBu-treated cells. This implies that NaBu could prevent stress-induced apoptosis. Similar results have been reported in breast cancer⁴⁰.

We also show that NaBu inhibits TNF alpha-induced inflammation in PSMCs with decreased NF-KappaB and IL1-Beta expression. These results are consistent with those obtained by in RAW264.7 cells^{29,41}.

Given the previous findings on the protective effect of HDAC inhibitors in experimental models of PAH^{25,42} and particularly on butyrate in systemic SMCs and cardiovascular diseases in general⁴³, and our comprehensive results in PASM extending those of others²⁶ we hypothesized that butyrate treatment would be protective in the development of monocrotaline-induced PH in rats. There are several experimental models for the study of PAH, with advantages and limitations of each^{28,44}. Our choice of the MCT model is first of all justified by the cellular mechanisms regulated by NaBu we have demonstrated in PSMCs. Indeed, butyrate is an anti-inflammatory⁴⁵ metabolite and an inhibitor of HDAC and, therefore, cell proliferation as mentioned above. The MCT model is also known for its inflammatory component and recapitulates PAH in many aspects²⁸. Our results showed that NaBu improved hemodynamic parameters by preventing the increase in right ventricular systolic pressure (RVSP) and right ventricular hypertrophy. The treatment also prevented the collapse of cardiac output (CO) which in turn, induced a decrease in pulmonary vascular resistance (PVR). Others have studied effects of butyrate in the hypoxia model in Sprague Dawley rats in a preventive protocol. However, butyrate could not reverse the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension in these rats when administered in a curative protocol after 2 and 4 weeks of hypoxic exposure²⁵. The limitations of this study are that firstly, the authors worked on a different strain of rat to ours and secondly, the mode of administration in drinking water because at the intestinal level, butyrate can be consumed rapidly by healthy colonocytes which use it as an energy source and therefore it is rapidly metabolized and does not have time to inhibit HDACs to trigger inhibition of proliferation in this cell type. This could explain the opposite result to ours²².

Other studies have reported that butyrate derivatives, including 4-phenylbutyric acid (4-PBA), induce protection against PH in rats in the hypoxic model⁴⁶ and in the MCT model³¹.

MCT-induced pulmonary vascular remodeling in rats is an important feature of PH in this model²⁸. The diseased rats showed arterial wall remodeling with increased muscularity of small caliber arteries and increased wall thickness. Preventive treatment with NaBu reduced vessel wall thickening and neo-muscularisation capacity of small pulmonary vessels by decreasing the number of muscularized vessels. Similar results were obtained in studies performed in MCT and hypoxic models demonstrating the ability of certain butyrate derivatives such as 4-PBA to reduce pulmonary vascular remodeling by attenuating endoplasmic reticulum stress^{31,46,47}.

Chronic pulmonary perivascular inflammation plays an essential role in the early stages of PAH. Significant infiltration of inflammatory cells (in pulmonary vascular lesions) and high circulating levels of specific cytokines have been found in patients with severe PAH³⁰. This inflammatory signature maintains pulmonary vascular remodeling and contributes to the development of PAH. Given the anti-inflammatory effect of butyrate, we examined its effects on cytokine production in the lungs of MCT rats. Analysis of cytokine profiles in lung tissue lysates showed MCT-induced upregulation of IL-6 gene expression and Cox-2 protein expression. NaBu treatment significantly reduced the expression of these markers of inflammation. These results are consistent with a study showing that sodium butyrate attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by inhibiting the Cox2 pathway via an HDAC5/HDAC6-dependent mechanism²⁴.

Endoplasmic reticulum (ER) stress is involved in the pathophysiology of PAH. Its reduction by 4-PBA prevents the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats⁴⁶. CHOP (transcription factor C/EBP homologue protein), a transcription factor that controls genes encoding components involved in apoptosis, is specifically expressed under conditions of ER dysfunction⁴⁸. The pro-apoptotic transcription factor CHOP mediates the ER stress response. The ER protective mechanism is known to control autophagy. ER stress is caused by proinflammatory cytokines such as TNF α , which leads to activation of the autophagy mechanism via the unfolded protein response. This helps to remove misfolded proteins to reduce inflammation⁴⁹. We showed that CHOP protein expression was significantly increased in the MCT group of rats. This increase was significantly decreased with NaBu treatment. These results are consistent with a study showing an increase in CHOP gene and protein expression at D7 and D14 and then a decrease at D28 in the MCT model⁵⁰. Sodium butyrate has also been shown to reduce endoplasmic reticulum stress by modulating CHOP and enhance anti-inflammatory immune metabolism in an obese mouse model⁵¹.

Pulmonary vascular remodeling is the key mechanism that contributes to pulmonary artery lumen obstruction in PAH and thus to increased PVR. The initiation of this process can be triggered by the migration and invasion of several cell types such as PAECs, PASMCs, inflammatory cells or fibroblasts. The extracellular matrix (ECM) is very dynamic and can be the reservoir of many growth factors capable of inducing the migration of these cells. The accumulation of ECM components, including collagens I, III and V, fibronectin, tenascin and biglycan by fibroblasts participates in remodeling⁵². Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent proteolytic enzymes and are known to regulate ECM turnover by degrading it⁵³. MMPs, which are involved in ECM modification, are poorly expressed in healthy tissue. However, their expression increases during tissue remodeling processes. Indeed, in some respiratory diseases, inflammatory cells such as macrophages, eosinophils, leukocytes and structural cells such as epithelial cells and fibroblasts secrete MMPs in the airways^{54,55}. In addition, high plasma levels of MMP-2 correlate with poor prognosis in human PAH³³ and MMP-9 activation promotes cell invasion and migration in gastric cancer³⁴. Our results indicate an increase in MMP-2 in MCT rats, which was significantly blocked in rats treated with NaBu. Similar results were obtained in a mouse model of induced allergic asthma. The authors showed that NaBu inhibits MMP-2 and MMP-9¹⁶. A clinical trial on remodeling found that bacteria from the airway microbiota, such as *Streptococcus* and *Prevotella* were associated with high expression of thrombospondin 1, which regulates a set of genes characteristic of extracellular matrix production such as metalloproteinases (MMP7, MMP9 and MMP12)⁵⁶. These bacterial genera are part of the CDK-producing bacteria, specifically of butyrate⁵⁷.

In the final part of this thesis, we performed an RNAseq study to identify potential targets of butyrate in the MCT-induced PH model of the rat. In this study, we identified 17 up-regulated and 25 down-regulated in NaBu-treated rats compared to untreated MCT rats. Enrichment analysis identified the top 50 butyrate-regulated pathways, such as IL-17A signaling, B cell activation, CD27 and TLR signaling. These differentially expressed genes have been associated with functions such as regulation of apoptosis, endothelial progenitor cell differentiation, cell cycle arrest, etc.

First, we focused on genes whose expression is decreased in MCT rats and increased with butyrate treatment such as Jun, CUX2, Has3, Sox15 Snca. Studies have shown that overexpression of CUX2 suppressed the proliferative, migratory and invasive abilities of glioma cells through ADCY1⁵⁸. This is consistent with our results showing that butyrate induces CUX2 expression. Furthermore, studies have shown that inhibition of CUX2 significantly inhibited proliferation, formation, migration and invasion of thyroid cancer cell

lines and induced epithelial-mesenchymal transition and influenced phosphorylation of AKT and mTOR in the PI3K-AKT-mTOR pathways ⁵⁹. It is also reported that deletion of CUX2 inhibits KDM5B to suppress breast cancer progression by overexpressing SOX17 ⁶⁰.

Has3 is essential for the extracellular matrix and regulates cell adhesion, migration and differentiation and its overexpression is reported to downregulate melanoma cell proliferation, migration and adhesion ⁶¹. These results confirm the role of butyrate in inhibiting cell proliferation, migration and invasion.

In a second step, we focused on genes whose expression is increased in diseased rats and decreased with NaBu treatment such as GUSB, MMP25, P2ry1, etc. The RNAseq study showed that butyrate treatment decreased the expression of β -glucuronidase (GUSB). Studies have shown that blocking GUSB inhibits cancer cell proliferation, invasion and migration by upregulating PD-L1 expression ⁶² and improved the efficacy of anti-cancer drugs ⁶³. This RNAseq study allowed us to identify a few genes that would be regulated by butyrate to ensure its protective role in the MCT-induced PH model in rats. It would therefore be interesting to measure the gene and protein expressions of these butyrate targets in the lung tissue and cells of PAH patients as well as in the different mechanisms leading to pulmonary vascular remodeling.

Acknowledgments

We thank Micheline KERGOAT, Michael BONNET and Christelle DELALANDE from Metabrain Research, Les Ulis, France

Conflict of Interest:

Sources of Funding

The LUMI project (Impact of LUng MIcrobiota in vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension: potential for innovative biotherapeutic target) was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) within ANR-18-CE14-0043 (to S.C-K).

From the French National Institute for the Health and Medical Research (INSERM), the University Paris-Saclay, the Groupe Saint Joseph Marie Lannelongue Hospital and Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569).

REFERENCES

1. Humbert, M. *et al.* 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.* **43**, 3618–3731 (2022).
2. Wang, D. *et al.* MicroRNA-124 controls the proliferative, migratory, and inflammatory phenotype of pulmonary vascular fibroblasts. *Circ. Res.* **114**, 67–78 (2014).
3. El Kasmi, K. C. *et al.* Adventitial fibroblasts induce a distinct proinflammatory/profibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 597–609 (2014).
4. Nouvelles mutations et pathogénèse de l’hypertension pulmonaire : progrès et énigmes dans la pathogénèse de la maladie. <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/CIRCRESAHA.122.320084>
doi:10.1161/CIRCRESAHA.122.320084.
5. Stacher, E. *et al.* Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 261–272 (2012).
6. Upton, P. D., Davies, R. J., Trembath, R. C. & Morrell, N. W. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 15794–15804 (2009).
7. Zhang, S. *et al.* Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L740-754 (2003).
8. Dorai, H., Vukicevic, S. & Sampath, T. K. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J. Cell. Physiol.* **184**, 37–45 (2000).
9. Stenmark, K. R. *et al.* The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Compr. Physiol.* **1**, 141–161 (2011).
10. Cox, M. J., Cookson, W. O. C. M. & Moffatt, M. F. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* **22**, R88–R94 (2013).
11. Budden, K. F. *et al.* Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir. Med.* **7**, 907–920 (2019).
12. Chotirmall, S. H. *et al.* Microbiomes in respiratory health and disease: An Asia-Pacific perspective. *Respirology* **22**, 240–250 (2017).
13. Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* **133**, 2485S-2493S (2003).
14. Guilloteau, P. *et al.* From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 366–384 (2010).
15. Cantoni, S. *et al.* Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration in pulmonary artery smooth muscle cells through Akt inhibition. *FEBS J.* **280**, 2042–2055 (2013).

16. Islam, R., Dash, D. & Singh, R. Intranasal curcumin and sodium butyrate modulates airway inflammation and fibrosis via HDAC inhibition in allergic asthma. *Cytokine* **149**, 155720 (2022).
17. Bridgeman, S., Woo, H. C., Newsholme, P. & Mamotte, C. Butyrate Lowers Cellular Cholesterol through HDAC Inhibition and Impaired SREBP-2 Signalling. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15506 (2022).
18. Zhao, L. *et al.* Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid. *Circulation* **126**, 455–467 (2012).
19. Zhang, H. *et al.* Histone deacetylase inhibitors synergize with sildenafil to suppress purine metabolism and proliferation in pulmonary hypertension. *Vascul. Pharmacol.* **149**, 107157 (2023).
20. Zhao, L. *et al.* Response to Letter Regarding Article, “Histone Deacetylation Inhibition in Pulmonary Hypertension: Therapeutic Potential of Valproic Acid and Suberoylanilide Hydroxamic Acid”. *Circulation* **127**, e540–e540 (2013).
21. Perros, F. *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 81–88 (2008).
22. Salvi, P. S. & Cowles, R. A. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells* **10**, 1775 (2021).
23. Hass, R., Busche, R., Luciano, L., Reale, E. & Engelhardt, W. Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. *Gastroenterology* **112**, 875–881 (1997).
24. Zhang, L. *et al.* Sodium butyrate attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by inhibiting COX2/PGE2 pathway via a HDAC5/HDAC6-dependent mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 8139–8150 (2019).
25. Karoor, V. *et al.* The Short-Chain Fatty Acid Butyrate Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling and Inflammation in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9916 (2021).
26. Cantoni, S. *et al.* Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration in pulmonary artery smooth muscle cells through Akt inhibition. *FEBS J.* **280**, 2042–2055 (2013).
27. Tang, C. *et al.* Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Biomed. Pharmacother.* **133**, 111081 (2021).
28. Pak, O. *et al.* Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Drug Discov. Today Dis. Models* **7**, 89–97 (2010).
29. Chen, G. *et al.* Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. *EBioMedicine* **30**, 317–325 (2018).
30. Wang, R.-R. *et al.* Immunity and inflammation in pulmonary arterial hypertension: From pathophysiology mechanisms to treatment perspective. *Pharmacol. Res.* **180**, 106238 (2022).
31. Wu, Y. *et al.* 4-Phenylbutyric Acid Induces Protection against Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *PLoS ONE* **11**, e0157538 (2016).

32. Jiang, H. *et al.* Xbp1s-Ddit3 promotes MCT-induced pulmonary hypertension. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **135**, 2467–2481 (2021).
33. Arvidsson, M., Ahmed, A., Säleby, J., Hesselstrand, R. & Rådegran, G. Plasma matrix metalloproteinase 2 is associated with severity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **12**, (2022).
34. Akter, H. *et al.* Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by neurotensin promotes cell invasion and migration through ERK pathway in gastric cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 6053–6062 (2015).
35. Fu, W. *et al.* Efficacy and safety of novel-targeted drugs in the treatment of pulmonary arterial hypertension: a Bayesian network meta-analysis. *Drug Deliv.* **28**, 1007–1019.
36. Moutsoglou, D. M. *et al.* Pulmonary Arterial Hypertension Patients Have a Proinflammatory Gut Microbiome and Altered Circulating Microbial Metabolites. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **207**, 740–756 (2023).
37. Losson, H., Schnekenburger, M., Dicato, M. & Diederich, M. Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer. *Mol. Basel Switz.* **21**, 1608 (2016).
38. Cavasin, M. A. *et al.* Selective class I histone deacetylase inhibition suppresses hypoxia-induced cardiopulmonary remodeling through an antiproliferative mechanism. *Circ. Res.* **110**, 739–748 (2012).
39. Ishimura, S. *et al.* Reduction of endoplasmic reticulum stress inhibits neointima formation after vascular injury. *Sci. Rep.* **4**, 6943 (2014).
40. Yonezawa, T., Kobayashi, Y. & Obara, Y. Short-chain fatty acids induce acute phosphorylation of the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway via GPR43 in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell. Signal.* **19**, 185–193 (2007).
41. Liu, T. *et al.* Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation* **35**, 1676–1684 (2012).
42. Kim, S.-H., Kim, K.-W. & Jeong, J.-W. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, through hypoxia-inducible factor-1 α suppression. *Oncol. Rep.* **17**, 793–797 (2007).
43. Feng, P., Ge, L., Akyhani, N. & Liau, G. Sodium butyrate is a potent modulator of smooth muscle cell proliferation and gene expression. *Cell Prolif.* **29**, 231–241 (1996).
44. de Jesus Perez, V. A. Molecular pathogenesis and current pathology of pulmonary hypertension. *Heart Fail. Rev.* **21**, 239–257 (2016).
45. Inan, M. S. *et al.* The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**, 724–734 (2000).
46. Koyama, M. *et al.* Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **306**, H1314–H1323 (2014).
47. Atténuation du stress du réticulum endoplasmique comme nouvelle stratégie thérapeutique dans l’hypertension pulmonaire. <https://www-ahajournals-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/epub/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.133413>
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.133413.

48. Knowlton, A. A. Life, death, the unfolded protein response and apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **73**, 1–2 (2007).
49. Huang, S., Xing, Y. & Liu, Y. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 α in metabolic regulation and disease. *J. Biol. Chem.* **294**, 18726–18741 (2019).
50. Wang, J.-J. *et al.* Evaluation and Treatment of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Right Ventricular Dysfunction during Monocrotaline-Induced Rat Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **30**, 587–598 (2016).
51. Kushwaha, V. *et al.* Sodium butyrate reduces endoplasmic reticulum stress by modulating CHOP and empowers favorable anti-inflammatory adipose tissue immune-metabolism in HFD fed mice model of obesity. *Food Chem. Mol. Sci.* **4**, 100079 (2022).
52. Postma, D. S. & Timens, W. Remodeling in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**, 434–439 (2006).
53. Huang, J., Olivenstein, R., Taha, R., Hamid, Q. & Ludwig, M. Enhanced Proteoglycan Deposition in the Airway Wall of Atopic Asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 725–729 (1999).
54. Giannandrea, M. & Parks, W. C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis. Model. Mech.* **7**, 193–203 (2014).
55. Ventura, I. *et al.* Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy* **69**, 898–905 (2014).
56. Mouraux, S. *et al.* Airway microbiota signals anabolic and catabolic remodeling in the transplanted lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 718-729.e7 (2018).
57. Louis, P. *et al.* Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *J. Bacteriol.* **186**, 2099–2106 (2004).
58. Yao, G. *et al.* CUX2 prevents the malignant progression of gliomas by enhancing ADCY1 transcription. *Exp. Brain Res.* **240**, 3153–3165 (2022).
59. Sun, Y. *et al.* CUX2 functions as an oncogene in papillary thyroid cancer. *Oncotargets Ther.* **12**, 217–224 (2019).
60. Li, L. *et al.* CUX2/KDM5B/SOX17 Axis Affects the Occurrence and Development of Breast Cancer. *Endocrinology* **163**, bqac110 (2022).
61. Takabe, P. *et al.* Hyaluronan synthase 3 (HAS3) overexpression downregulates MV3 melanoma cell proliferation, migration and adhesion. *Exp. Cell Res.* **337**, 1–15 (2015).
62. Kong, X. *et al.* Over-Expression of GUSB Leads to Primary Resistance of Anti-PD1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Front. Immunol.* **13**, 876048 (2022).
63. Bhatt, A. P. *et al.* Targeted inhibition of gut bacterial β -glucuronidase activity enhances anticancer drug efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 7374–7381 (2020).
64. Dumas, S. J. *et al.* NMDA-Type Glutamate Receptor Activation Promotes Vascular Remodeling and Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **137**, 2371–2389 (2018).
65. R : Le projet R pour le calcul statistique. <https://www.r-project.org/>.
66. Citing RStudio. *Posit Support* <https://support.posit.co/hc/en-us/articles/206212048-Citing-RStudio> (2023).
67. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* **47**, e47 (2019).

68. Chen, Y., Lun, A. T. L. & Smyth, G. K. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research* **5**, 1438 (2016).
69. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
70. Zenodo - Research. Shared. <https://help.zenodo.org/>.
71. Liberzon, A. *et al.* The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* **1**, 417–425 (2015).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Butyrate and its receptors are dysregulated in the lung and vascular cells of PAH patients

(n = 5 control, 5 iPAH). (A) Western blot of GPR41 and GPR43 in lung tissue from control and iPAH patients. Left set: Image of western blot. Right set: western blot quantification. Values are GPR41 or GPR42 to ACTB signal intensities. (B) Quantitative RT-qPCR analysis of *GPR41* gene expression relative to ACTB gene expression on total RNA from lung tissue from control and iPAH patients. (C) Quantitative RT-qPCR analysis of *GPR43* gene expression relative to ACTB gene expression on total RNA from lung tissue from control and iPAH patients.

Two-tailed unpaired Student's t-tests (Mann-Whitney test) assessed the difference between two groups. ns = not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

Figure 2: NaBu reduced spontaneous and PDGF-induced proliferation in PASMIC controls.

(A) MTS at 24 h using a concentration scale of NaBu (n = 4). Significance relative to untreated and PDGF-stimulated cells is shown. (B) BrdU at 24 h using the same increasing NaBu concentration scale. Significance relative to control and PDGF-treated cells is shown. (C) The proliferation rate of PASMICs was investigated by iCELLigence for real-time measurement of electrical impedance after seeding 5,000 cells into culture wells embedded in microelectrodes. Four conditions were tested: control cells (basal medium), cells stimulated with PDGF-BB (20 ng/ml), cells treated with PDGF-BB (20 ng/ml) + NaBu (5 mM) and cells treated with NaBu (5 mM) only (n = 4 in each group). Statistical analysis was performed 48,72 and 96 hours after the stimulations. (D) Immunofluorescence of the proliferation marker Ki67 (red); nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for blue. Left set: Immunofluorescence image. Right set: Quantification of Ki67 staining; results are expressed in pixels (calculated with the artificial intelligence software IPSDK). (E) Western blot of protein expression of Akt survival protein phosphorylation after 24 h treatment with or without NaBu (5 mM) in the presence of PDGF (20 ng/ml) and protein expression of negative cell cycle regulators (p21 and p27) under the same conditions. Left set: Image of western blot (pAKT, AKT, p21 and p27). Right panel: western blot quantification. Values are ratio of pAKT to total AKT and p21 or p27 to ACTB signal intensities. (F) Western blot of protein expression analysis of PDGF (20 ng/ml) dependent cell proliferation markers, PCNA and Erk1/2 at different times

in the presence or absence of NaBu (5 mM). Left panel: Western blot image (pERK1/2, total ERK1/2 and PCNA). Right panel: Western blot quantification. Values are ratio of pERK1/2 to total ERK1/2 and PCNA to ACTB signal intensity. **(G)** Migration assay in PSMCs. In silicone inserts (IBIDI), 1×10^4 were seeded. After 24 h of incubation to promote adhesion, cells were put back into basal medium and stimulated with PDGF (20 ng/ml) in the presence or absence of NaBu (5 mM). $1 \mu\text{M}$ cytosine D-arabinoose was added to the culture medium to block proliferation. The broken line indicates time zero. Quantitative results of the migration test ($n=3$); the measurement was obtained from the difference between the migration area after 24 h and the initial slit area. **(H)** Western blot of protein expressions of inflammation markers (IL1-Beta and phospho NFkB) in PSMCs treated with TNF alpha (20 ng/ml) with or without NaBu (5 mM). PSMCs were pre-incubated with NaBu for 24 h and then treated 30 min for phospho NFkB and 24 h for IL-1 beta. Left set: Western blot image of phospho NF-KB and IL-1 Beta. Right panel: Western blot quantification. Values are ratio of pNF-KB and IL-1 Beta to ACTB. Statistical analysis: The difference between two groups was assessed by the unpaired two-tailed Student's t test (Mann-whitney test). Difference among three groups were assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses. Significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 3: NaBu treatment *in vivo* impacts the development of MCT-induced PH.

(A) Experimental design. Sodium butyrate (400 mg/kg/d for 3 weeks) was administered to rats in the MCT + NaBu group by intraperitoneal injection. **(B)** Right ventricular systolic pressure (RVSP) (mm Hg; $n = 9$ to 12 different rats per condition). **(C)** Cardiac output (CO) (ml/min; $n = 7-10$ different rats per condition). **(D)** Pulmonary vascular resistance (PVR) assessed by the PVR/CO ratio ($n = 6-10$ different rats per condition). **(E)** Fulton index (RV/LV+S; $n = 9-12$ different rats per condition). **(F)** Pulmonary vessel occlusion (%) analyzed by saffron hematoxylin-eosin (HES) staining ($n = 5$ rats per condition) with the percentage of non-muscular and muscular vessels (100 vessels per rat; $n = 4$ to 7 rats) measured by immunostaining against α -smooth muscle actin (αSMA) and von Willebrand factor (VWF). ns = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$. Differences between the three groups were assessed with a one-way ANOVA supplemented with Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses. Scale bars, 100 μm .

Figure 4: NaBu attenuates PH by regulating several mechanisms

Sodium butyrate inhibits the expression of markers of inflammation in total rat lung. **(A)** Western blot of protein expressions of inflammation marker (Cox-2). Left set: Western blot image of Cox-2. Right set: Western blot quantification. Value is ratio of Cox-2 to ACTB. **(B)** Quantitative RT-qPCR analysis of IL6 gene expression relative to ACTB gene expression on total RNA from lung tissue. **(C)** NaBu inhibits endoplasmic reticulum stress (ER stress) in total rat lung. Western blot of protein expressions of the transcription factors of ER stress Chop and ATF4. Left set: Western blot image of Chop and ATF4. Right panel: Western blot quantification. Values are ratio of Chop or ATF4 to ACTB. **(D)** NaBu inhibits cell invasion and migration in total rat lung. Left set: Western blot image of MMP2. Right set: Western blot quantification. Value is the ratio of MMP2 to ACTB. **(E)** Pulmonary arteries (PA) of control rats pre-contracted with U46619 (1 μ mol/L) and NaBu (5 mM) versus the same volume of DMSO produces PA relaxation. Difference among three groups were assayed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses. ns = non-significant; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001

Figure 5: RNAseq results and genes regulated by NaBu treatment.

(A) Principal component analysis of differentially expressed genes at $P < 0.05$. **(B)** Venn diagram representing the number of differentially expressed genes in different comparisons. **(B)** Venn diagram representing the number of differentially expressed genes in the different comparisons (Cont-vs-MCT and MCT-vs-MCT+NaBu). **(C)** Heat map showing genes down-regulated by MCT and up-regulated by NaBu treatment. Left image: Heat map. Right images: Quantification of the expression of some random genes. **(D)** Heat map showing genes upregulated by MCT and downregulated by NaBu. Left image: Heat map. Right images: Quantification of the expression of some random genes. **(E)** Graphical representation of the signaling pathways regulated by butyrate treatment. **(F)** Representation of the regulatory network: genes in red color are up-regulated and genes in green color are down-regulated. Jun which is increased by butyrate treatment and Gusb decreased by butyrate are very connected.

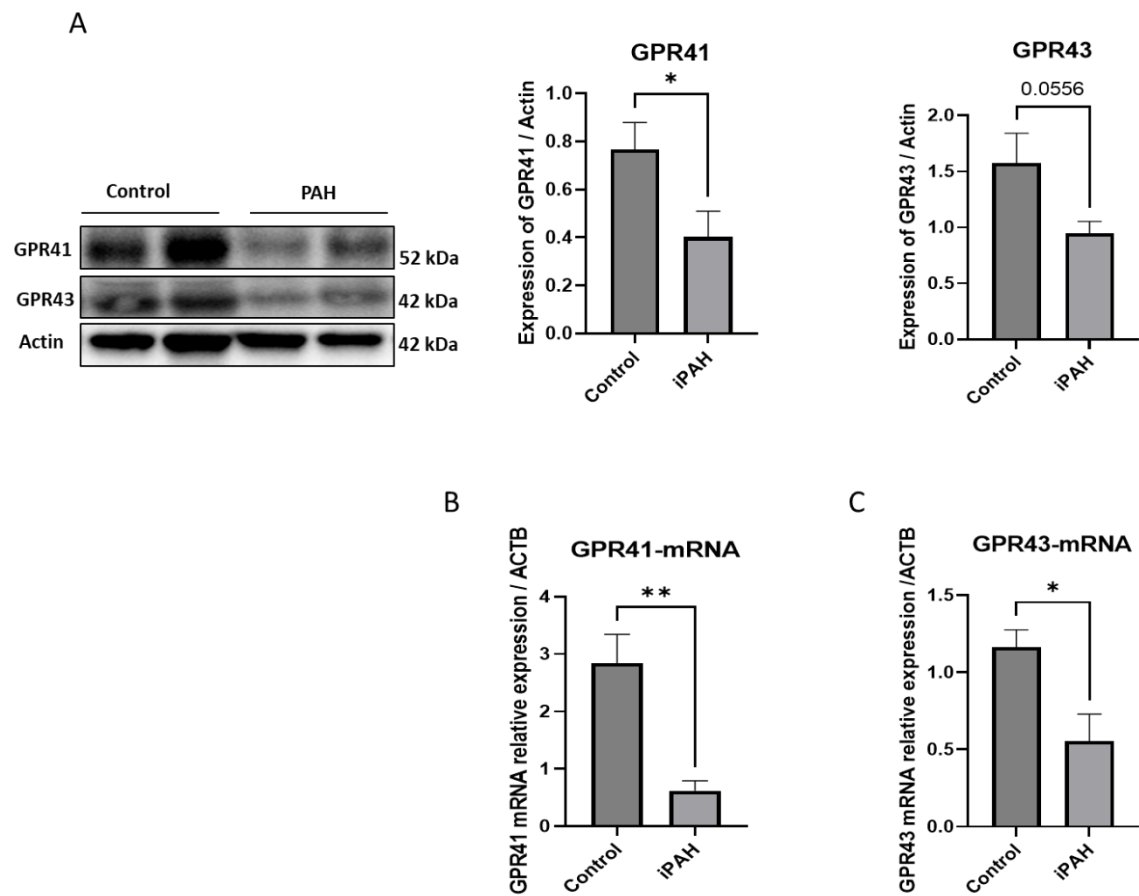


Figure 1: Butyrate and its receptors are dysregulated in the lung and vascular cells of PAH patients

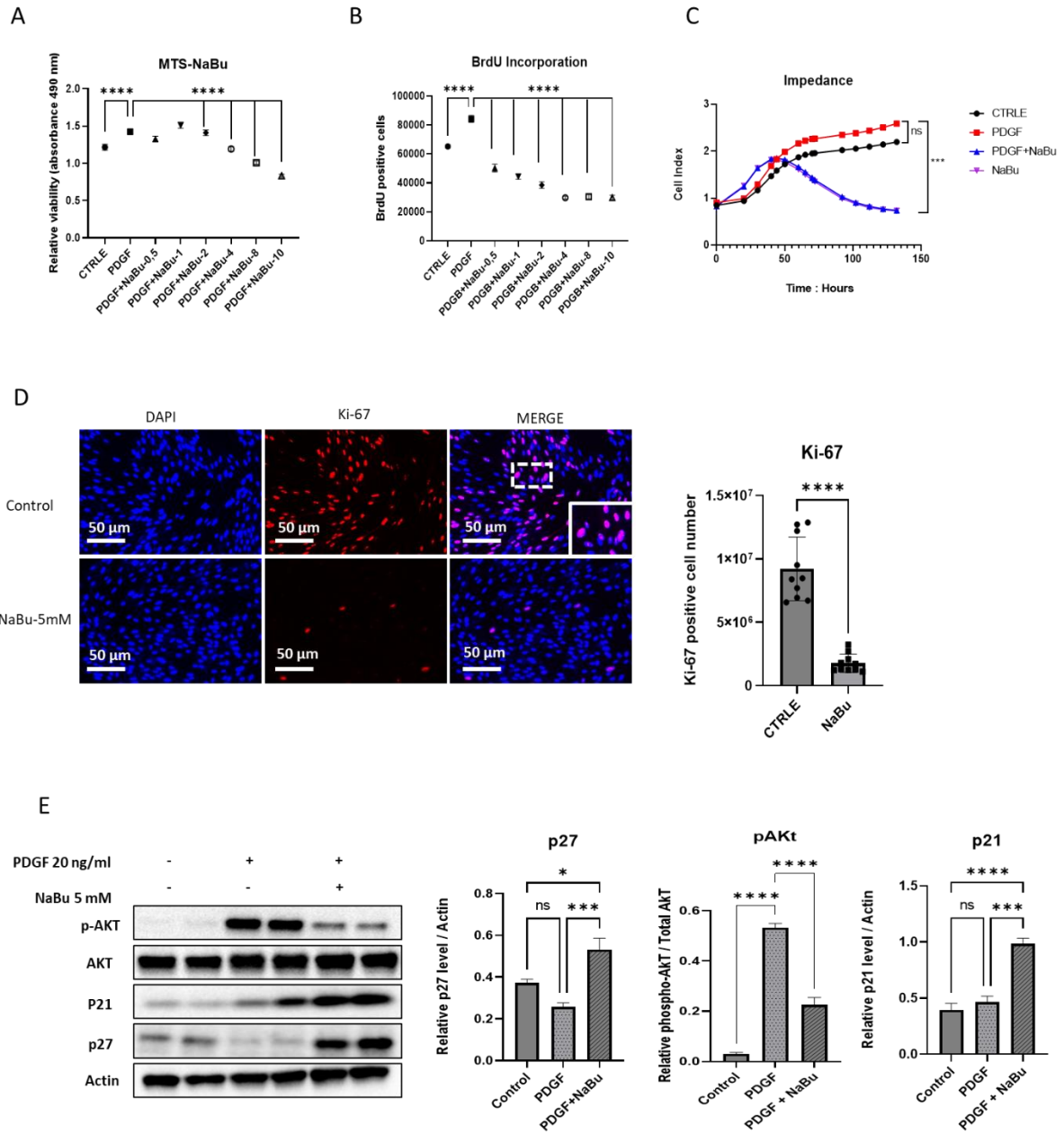
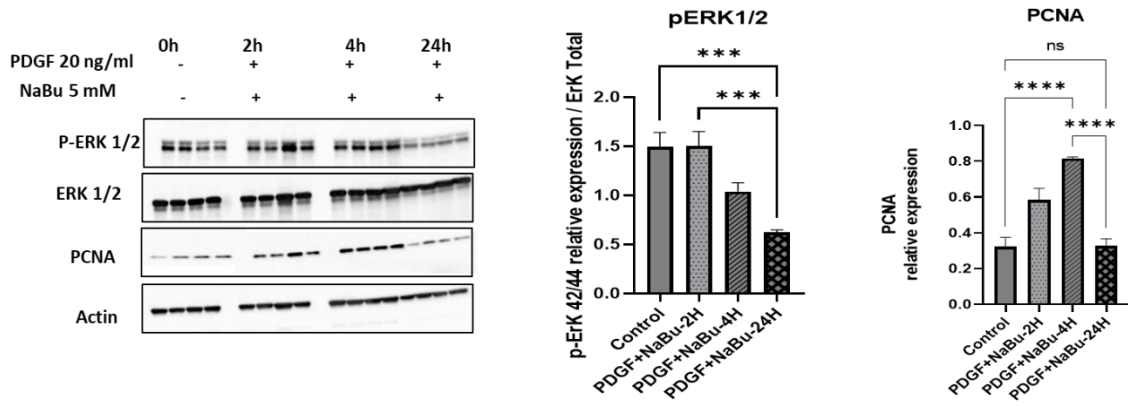
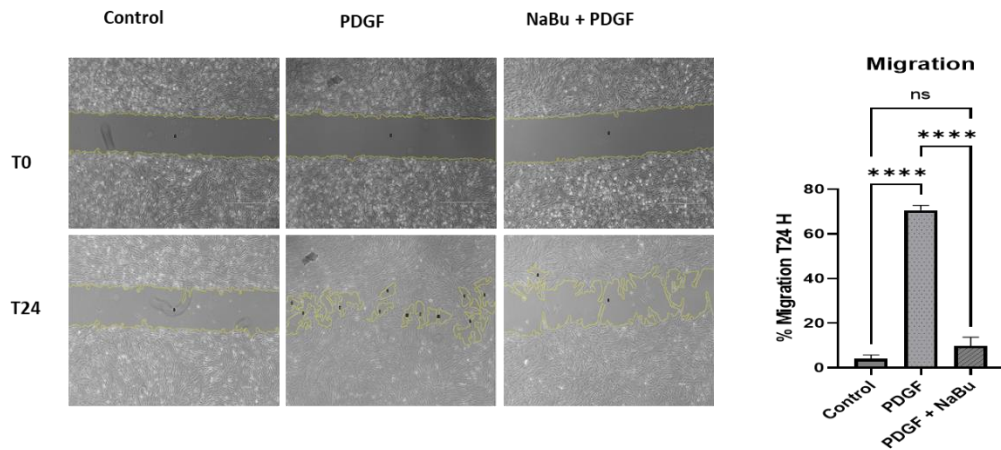


Figure 2: NaBu reduced spontaneous and PDGF-induced proliferation in PASM cells.

F



G



H

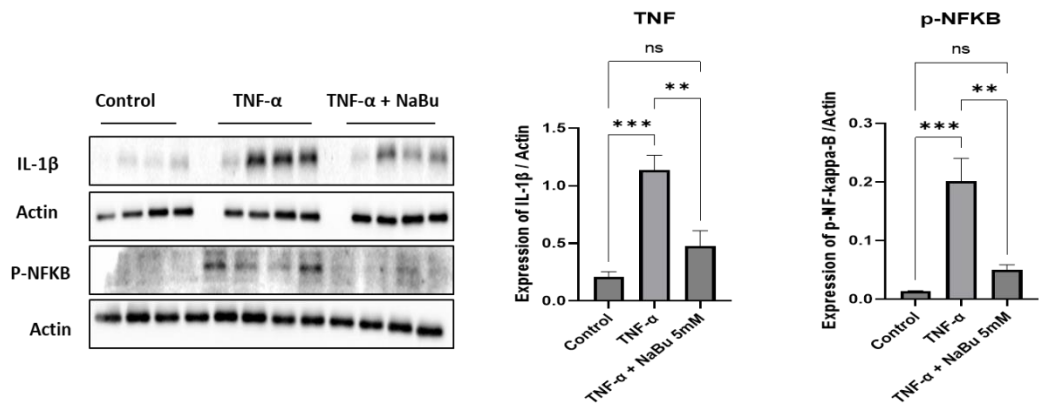


Figure 2: Continued

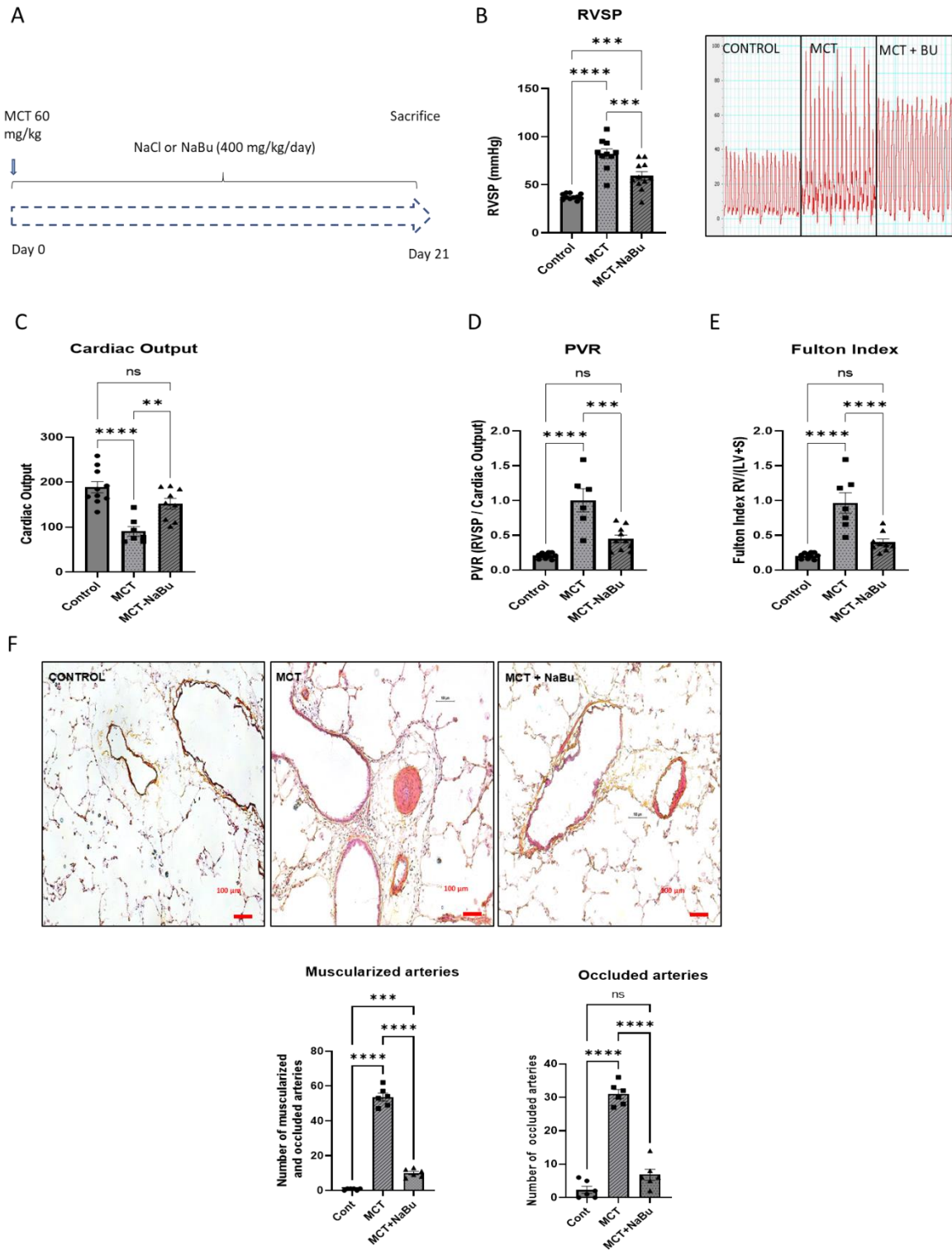


Figure 3: NaBu treatment *in vivo* impacts the development of MCT-induced PH.

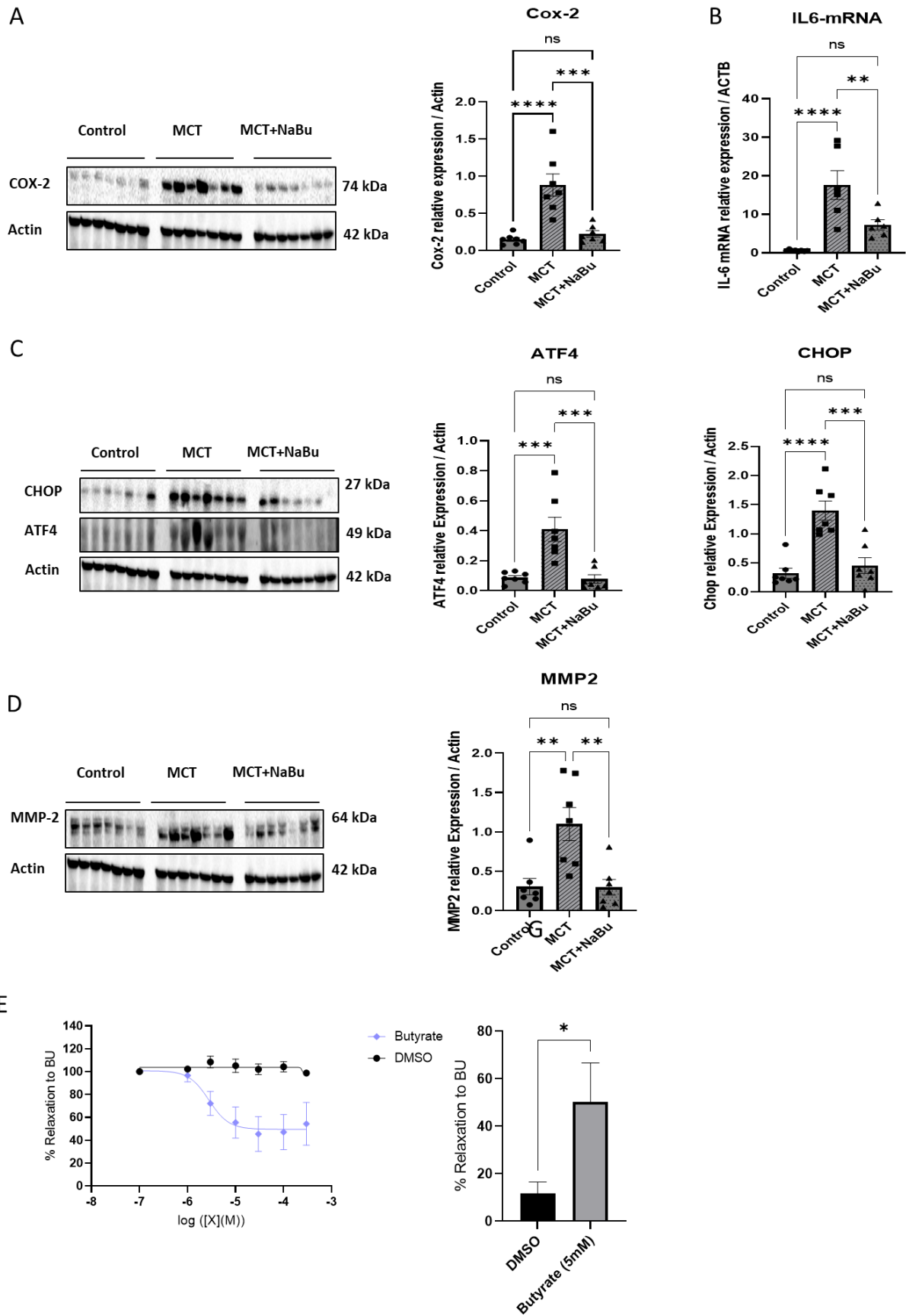
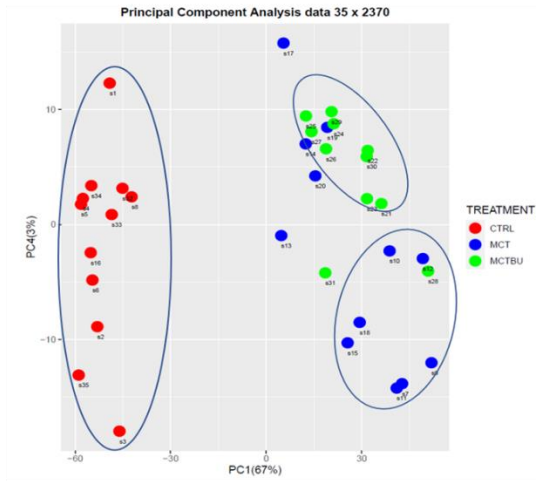


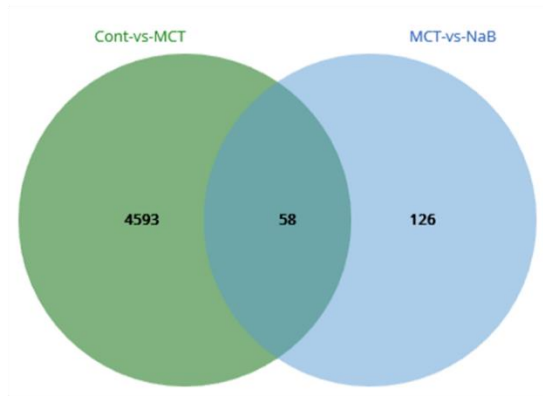
Figure 4: NaBu attenuates PH by regulating several mechanisms.

Figure 5.

A



B



C

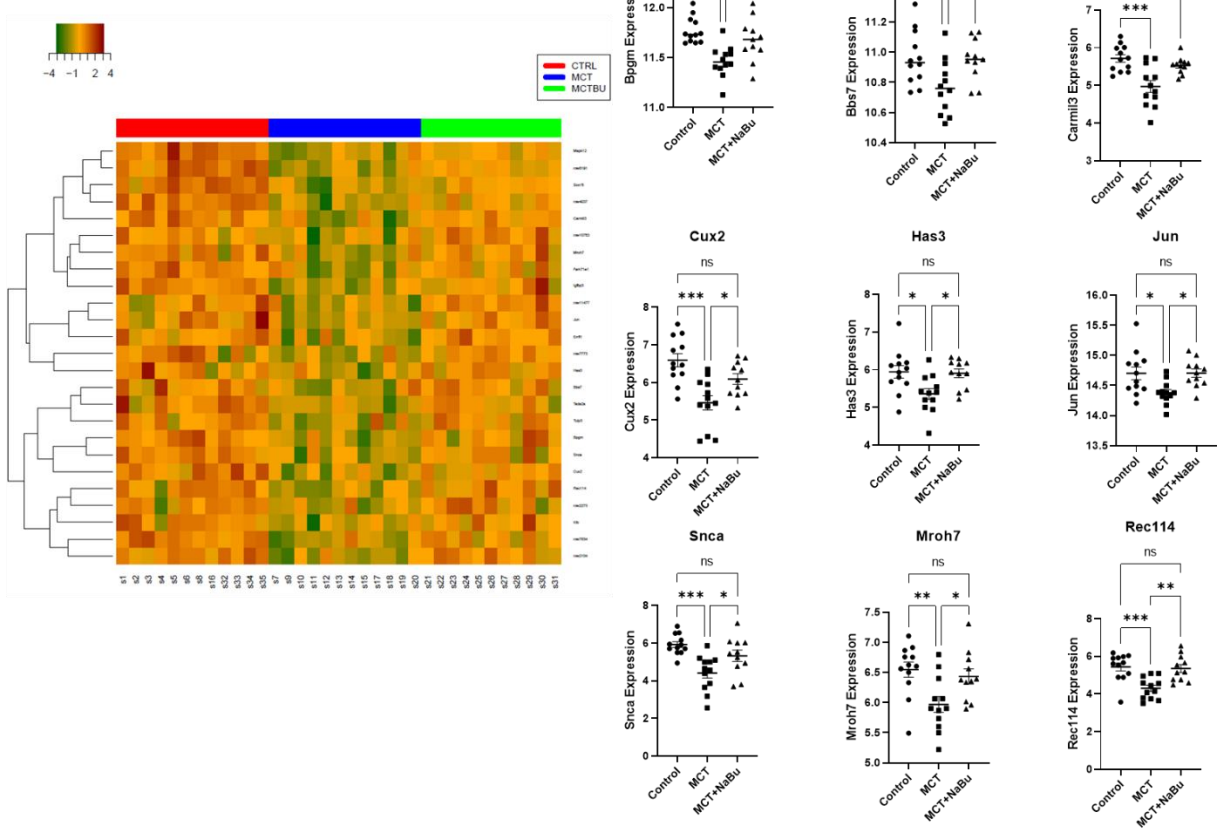


Figure 5: RNAseq results and genes regulated by NaBu treatment.

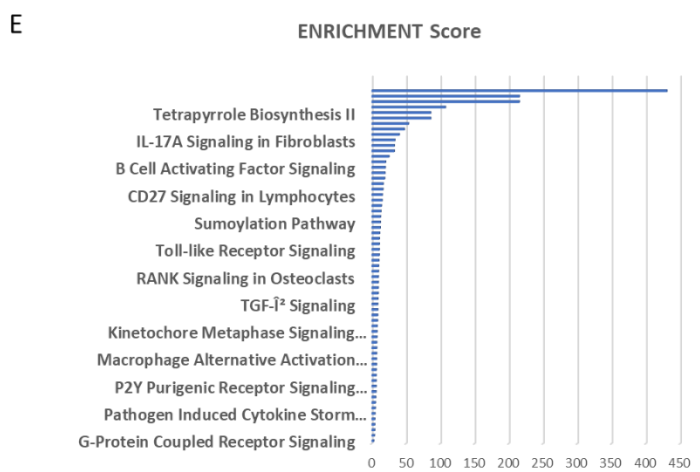
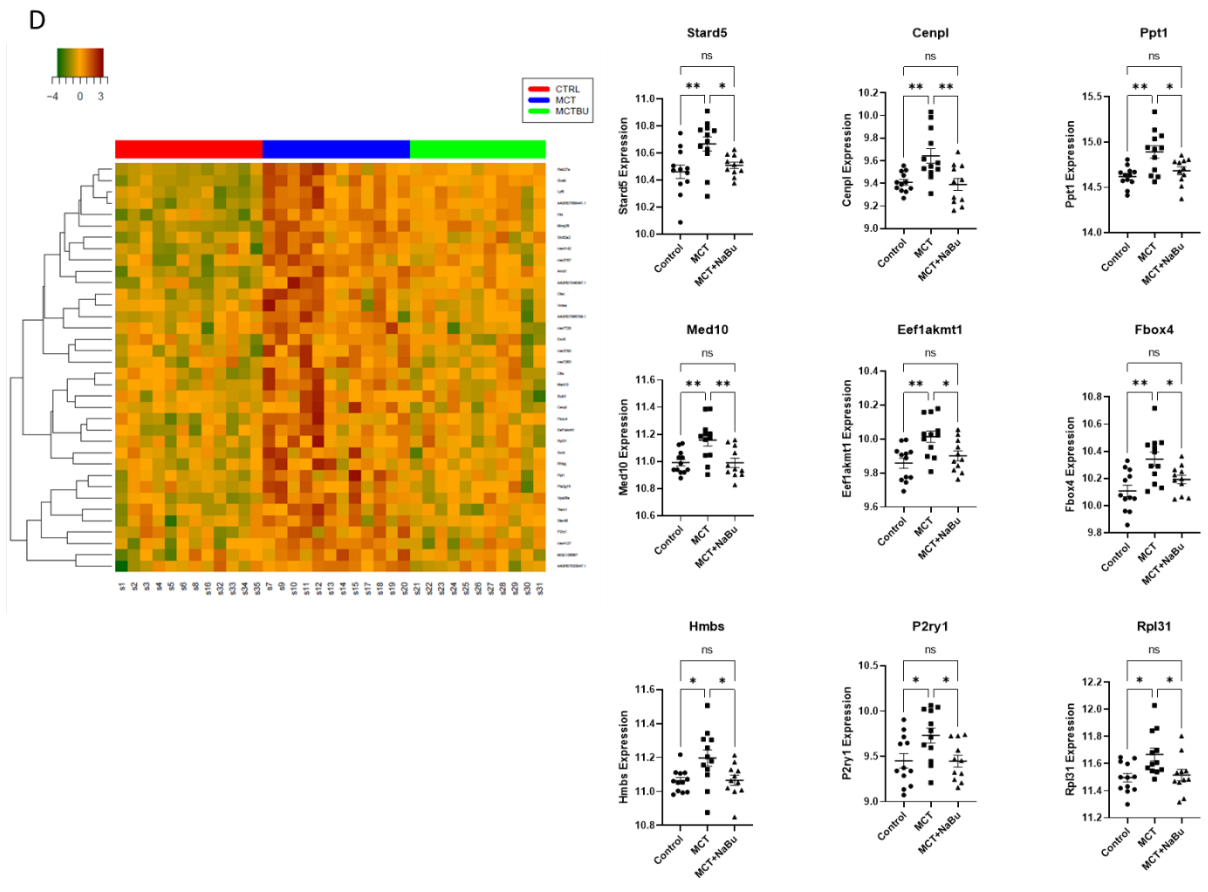


Figure 5: continued

F

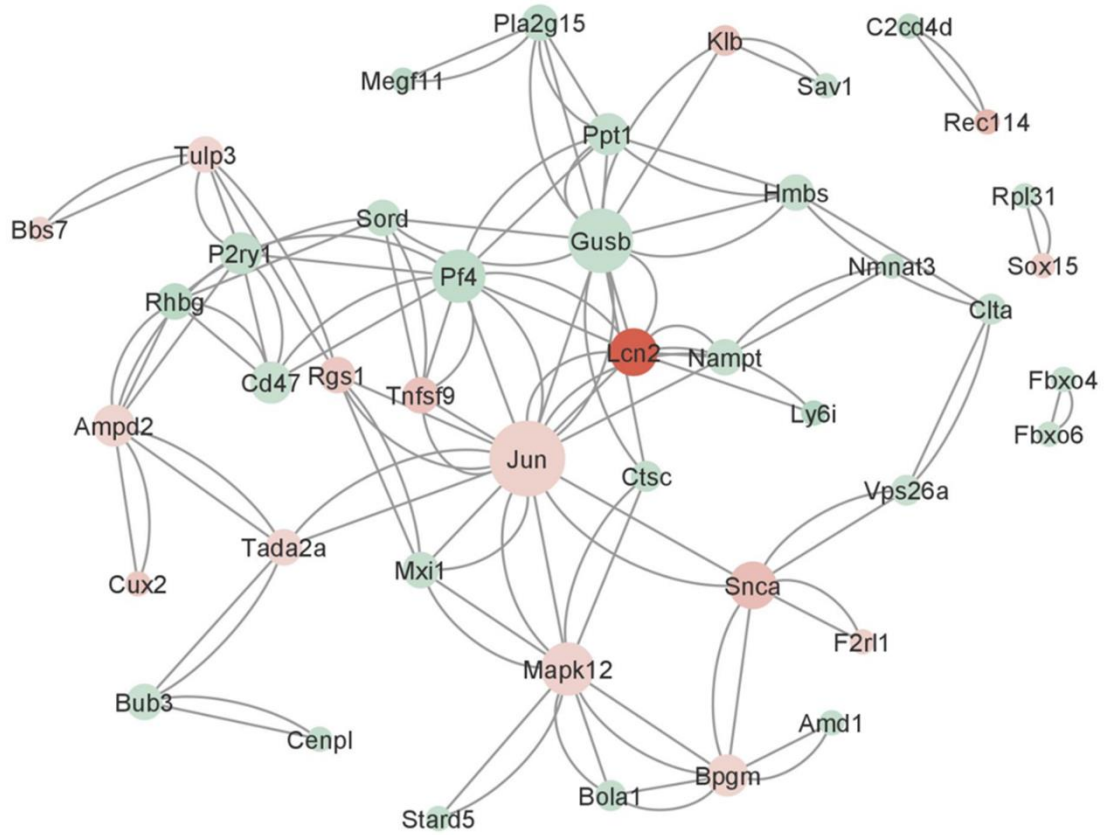


Figure 5: continued

METHODS

Human subjects.

Pulmonary arteries from human lung samples were collected during lung transplantation from PAH patients or remote from tumor sites from lung cancer patients undergoing lobectomy or pneumonectomy for control samples. Pulmonary arteries were dissected from the lungs and denuded to remove the endothelial cell layer. Arteries were lysed for mRNA or protein extraction. Patients were part of the French Pulmonary Hypertension Network, a program approved by our institutional ethics committee CPP IDF VII (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII) and had given written informed consent (Protocol No. AC-2020-4284, RCB: CRB-SUP-PRC-008, October 27, 2002). They were all diagnosed and followed in our National Reference Center for Severe Pulmonary Hypertension (Kremlin Bicêtre Hospital), in accordance with all standards and guidelines.

Sexe	Age	Diagnostic	mPAP	CO	POD	PAPO	PVR
M	68	HTAPi	63	5,9	18	15	3,7
M	51	HTAPi	55	3,6	8	13	14,1
F	45	HTAPi	48	3,3	10	5	12,3
M	51	HTAPi	47	7,5	5	7	5,3
F	45	HTAPi	76	6,6	12	10	11,5
M	60	HTAPi	64	5,14	8	6	11,3
F	43	HTAPi	49	5,23	7	10	7,5
F	59	Cancer					
M	21	Cancer					
M	68	Cancer					
M	54	Cancer					
M	81	Cancer					

Table 1: patients informations

Culture of human PASMCs and PAECs

Control human lung samples were obtained from lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer in control subjects to isolate PASMCs and PAECs. Pulmonary arteries were studied remote from tumor areas. Cells from iPAH patients were harvested from pulmonary arteries derived from human lung transplantation samples. Human PAECs and PASMCs were cultured as previously described⁶⁴ and were used for the study between passages 3 and 5.

PASMCs were purchased from Lonza and obtained at passage 3. According to the manufacturer, they were isolated from the area surrounding the pulmonary artery trunk, and the phenotype of the smooth muscle cells was checked for positive expression of α -smooth muscle actin and negative expression of von Willebrand factor. We used five different PASMC lines from healthy donors (refs 20157, 29837, 28627, 15673, and 34295). The characteristics of these cell lines are shown in Table 2. The cells were cultured in smooth muscle cell growth medium-2 (Lonza, Basel, Switzerland) and used for experiments between P4 and P7.

Animals

The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N° A94046247) from METABRAIN RESEARCH. This study was approved by the committee on the Ethics of Animal experiments (CEEA26 (Animal Experimentation Ethics Committee no. 26)). The animal experiments were performed in compliance with the guidelines from Directive 2010/63/EU on 22 September 2010 of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and complied with the French institution's guidelines for animal care and handling.

Induction of pulmonary hypertension and treatment with sodium butyrate (NaBu)

Male Wistar rats (200 g) were used and maintained in a temperature-controlled room with a 12:12 light-dark cycle. The in vivo experimental setup was as follows: pulmonary hypertension was induced in rats by a single subcutaneous injection of monocrotaline (MCT; 60 mg/kg). MCT was dissolved in HCl (1 N) neutralized with NaOH (1 N). Monocrotaline (MCT) and Sodium butyrate were obtained from Sigma. Rats exposed to MCT were treated with an intraperitoneal (IP) injection of Sodium butyrate (400 mg/kg/day) for 21 days in a preventive protocol.

Hemodynamic measurements

Hemodynamic measurements were performed 21 days after exposure to TCM and treatment with (NaBu). Rats were placed under general anesthesia and spontaneous respiration with an Isoflurane Rodent Anesthesia System (Minerve, Esternay, France) (maintenance: 2% isoflurane in room air). Hemodynamic measurements, such as right ventricular systolic pressure (RVSP; mmHg) and cardiac output (CO; mL/min) were performed. After assessment of RVSP and CO, we inserted a catheter into the carotid artery to measure systemic blood pressure. All analyses were performed in a blinded fashion: the experimental conditions of the rats were unknown to the operator during catheterization and data interpretation. PVRs were assessed by calculating the RVSP/CO ratio. The Fulton index measuring right ventricular (RV) hypertrophy was calculated as the ratio of RV weight to left ventricular (LV) plus septal (S) weight (RV/LV+S). Under deep anesthesia (5% isoflurane), animals were euthanized by exsanguination for tissue collection for molecular biology analyses.

Cell proliferation and cell migration analysis in real time using the iCELLigence.

The proliferation assay was performed using the iCELLigence system (ACEA Biosciences, San Diego, CA) as previously described. The iCELLigence instrument uses noninvasive electrical impedance monitoring to quantify cellular characteristics such as proliferation and migration in real time and without labels. To do this, the electrical impedance measured under the cells (which is proportional to the surface coverage) was monitored and analyzed. To begin, 5000 cells were seeded per well; after 2 hours of cell adhesion, they were placed in SmBM + 0.1% FBS for 24 hours. PDGF-BB (20 ng/ml) with/without NaBu (5 mM) was then added to the test wells, while the medium was used as vehicle for the control wells. Real-time electrical impedance was measured and recorded by microelectrodes inserted into the bottom of each culture well during the entire procedure (from seeding to 96 hours after PDGF stimulation). For data analysis, the time when stimulation was performed is considered the baseline, and subsequent measurements were calculated as the relative difference from this point in percentage, since it is proportional to the surface area of the dish covered with cells.

BrDu incorporation to evaluate the PASMCM proliferation.

To evaluate cell proliferation, we measured BrDu incorporation to identify cell undergoing DNA replication, using a DELFIA cell proliferation kit (AD0200, PerkinElmer). Experiments were performed according to the kit recommendations. To evaluate the proliferation state of the

cells, different treatment was used: PDGF (20 ng/ml) To stimulate the cell proliferation and different concentration of NaBu.

Wound healing assay

We used the wound healing assay to assess cell migration. After 24 hours of starvation (minimal medium devoid of growth factors: FBS, EGF, and insulin), human PSMCs were placed in a culture insert (Cat. No. 90209; Ibidi) at a density of 11000 cells per well in fresh medium containing cytosine D-arabinoside (10 μ mol/L). After the cells had adhered for 24 hours, we removed the culture insert and washed the cells with phosphate-buffered saline (PBS) to remove nonadherent cells. We then added fresh medium with different treatments (PDGF 20 ng/ml with or without 5 mM NaBu). Photographs of the migration area were taken from time 0 (T0) to T24 hours. Cell migration into the wound space was quantified using Image J software. Cell motility/invasion was assessed by the percentage of wound closure 24 h after the onset of healing ($[(T0 \text{ area} - T24 \text{ area}) \div T24 \text{ area}] \times 100$).

Real-time PCR.

Total RNA from human and rat lung tissue was extracted and cDNA was synthesized using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher). qPCR was performed in duplicate with Taqman Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher) using a StepOnePlus real-time PCR system (Thermo Fisher). Results were analyzed with StepOne version 2.0 software. Results were considered positive when the Ct value was less than 35 cycles, and gene expressions were normalized to ACTB gene expression.

Gene	Pimer reference	Species	Supplier
<i>GPR41</i>	Hs02519193_g1	Human	Life Technologies
<i>GPR41</i>	Hs00271142_s1	Human	Life Technologies
<i>GPR109A</i>	Hs02341584_s1	Human	Life Technologies
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1	Human	Thermo Fisher Scientific
<i>ACTB</i>	Rn00667869_m1	Rat	Thermo Fisher Scientific
<i>PCNA</i>	Rn01514538_m1	Rat	Thermo Fisher Scientific
<i>IL6</i>	Rn01410330_m1	Rat	Thermo Fisher Scientific

Table 2: Primers used for RT-qPCR

Western blot analysis

Western blot analyses were performed within standard parameters. Briefly, PASMCs were starved for 24 hours in basal smooth muscle cell medium (SmBM; Lonza) before stimulation (0.5 to 20 mM NaBu, 20 ng/ml PDGF, 20 ng/ml TNF alpha, and 100 μ M U46619) and then lysed in radioimmunoprecipitation buffer (RIPA) supplemented with 0.1% Triton X-100 and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher). The proteins (30 μ g) were then subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Little Chalfont, UK). After blocking, the membranes were incubated overnight with the primary antibodies and then incubated for 1 hour with HRP-conjugated secondary antibodies. The antibodies used are listed in Table 2 with the different dilutions. The following chemicals were used: PDGF-BB (R&D Systems), Sodium butyrate (Sigma Aldrich) and U46619 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN).

Characteristics of primary antibodies used in Immunoblot studies

Antibody	Species	Dilution	Supplier	Reference
Phospho Akt (ser 473)	Mouse	1/1000	CST	4051S
Phospho Akt (T308)	Rabbit	1/1000	CST	4056S
Akt (PAN)	Rabbit	1/1000	CST	4691P
Phospho ERK (T202/Y204)	Rabbit	1/1000	CST	9106S
ERK	Rabbit	1/1000	CST	4695P
PCNA	Mouse	1/1000	Dako	M0879
GPR41	Rabbit	1/400	Cayman	16104
GPR43	Rabbit	1/400	Cayman	15727
p21	Rabbit	1/1000	CST	2947S
p27	Rabbit	1/1000	CST	3686S
Actin	Mouse	1/10000	CST	7076S
Il-1beta	Rabbit	1/1000	Abcam	ab254360
Phospho NFKB (Ser 468)	Rabbit	1/1000	CST	3039S
NFKB	Rabbit	1/1000	CST	8242S
Ki-67	Rabbit	1/400	Abcam	ab15580
Cox-2	Rabbit	1/1000	CST	12282S
MMP-2	Rabbit	1/1000	Abcam	ab92536

CHOP	Mouse	1/1000	CST	2895S
ATF4	Rabbit	1/1000	CST	11815S
GPR78	Rabbit	1/1000	Invitrogen	MA5-27686

Table 3: Antibodies used for Western blot and Immunofluorescence

Analysis of pulmonary vessel remodeling.

Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in kerosene, and serially sectioned (5 μm). Morphometric analyses were performed on hematein-eosin-safran (HES)-stained sections. Lung samples from all conditions were analyzed by conventional light microscopy using semiautomated quantitative software (NIS-BR; Nikon, Champigny sur Marne, France). Vascular remodeling was assessed in all pulmonary vessels larger than 50 μm and smaller than 100 μm that were identified in 20 randomly selected microscopic fields per tissue section. Vessels were classified into two groups: numbers of muscularized arteries and numbers of occluded arteries.

Isometric Tension Measurement

APs from control rats were mounted on an emkaBATH4 modular tissue bath system (EMKA Technology, Paris, France) coupled to IOX software. The PAs were adjusted to optimal length by balancing against a passive load of 0.6 g. Vessels were bathed in Krebs solution containing (in mmol/L) 119 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.17 MgSO₄, 1.18 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, and 11 glucose at 37°C and continuously aerated with a mixture of CO₂/O₂ (5%/95%). After the addition of Krebs solution, vessels were contracted with 100 mmol/L of K⁺ -(K100)-containing solutions. Once a plateau was reached, the vessels were washed with the Krebs solution for 30 minutes. DMSO or NaBu at increasing doses and then at the 5-mM dose was used as a pretreatment before the U46619 dose response (0.1 nM-3 μM). All modified Krebs solutions modified Krebs solutions prepared with various concentrations of KCl (K10 to K100) had an equimolar substitution of NaCl to maintain a constant concentration of KCl. NaCl to maintain osmolarity and [Cl⁻ relative to the standard Krebs solution. The contractile response was expressed relative to the response to the K100 test.

Immunofluorescence staining.

Frozen lung sections (6 μm) were air-dried. Lab-Tek (Chamber Slide system 177445 8 well Permanox; Thermo Fisher Scientific) sections or slides that were used for cell culture were

fixed with paraformaldehyde (PFA 4%) for 10 min at room temperature. The free aldehyde groups from the PFA fixation were soaked for 10 min with a 50 mM NH₄Cl solution. The sections were blocked with human (10%) or rat (10%) serum in PBS for 1 h at room temperature. We used primary antibodies against VWF (1/400, Dako A0082), α -smooth muscle actin (α -SMA, Sigma, F3777) (1/200), and Ki-67. Primary antibody detection was performed with goat anti-rabbit secondary antibodies (1/200). Slides were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

RNA purification and RNA sequencing data analysis

Total RNA was extracted from Rat lung tissue using RNeasy Mini kit 74106 (Qiagen) with DNase digestion. RNA was qualified for purity on a NanoDrop (Thermo Scientific) spectrophotometer, and for integrity on a Bioanalyzer 2100 using RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies). RNA concentration was measured on a Xenius (Safas) fluorimeter using Quantiluor® RNA kit (Promega).

Directional RNA-Seq Libraries were constructed using the TruSeq Stranded mRNA library prep kit (Illumina), following the manufacturer's instructions, 1 μ g of total RNA was used. Final library quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit, and library concentration was measured on a Xenius (Safas) fluorimeter using PicoGreen™ kit (Invitrogen), and by qPCR. Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced in 3 paired-end 2x100 bp runs, on an Illumina NovaSeq instrument. Sequencing was done by Integragen (Evry, France).

Demultiplexing has been done with bcl2fastq2 tools (V2.15.0) and trimming reads adapters with Cutadapt (v1.3). All downstream analysis was performed using R⁶⁵ and RStudio⁶⁶. Reads were independently mapped to the rat genome mRatBN7.2 and counted with gtf_ensembl_release_108 at gene level using Rsubread⁶⁷. Genes with count mean lower than 10 were discarded for downstream analyses. TMM normalization was done using edgeR⁶⁸ and data were linearized with voom function from Limma⁶⁹. Then we used a bioanalysis pipeline to find differentially express gene patterns across our 3 treatment groups and make functional enrichment analysis⁷⁰. Briefly, we applied a one-way analysis of variance for TREATMENT factor for each gene and made pairwise Tukey's post hoc tests between groups. We found two lists of gene corresponding to our two patterns of interest. Each selected gene has at least two significant p-values (< 0.05) across contrasts and fold-change >1.01 for upregulation or fold-change < -1.01 for downregulation.

For functional enrichment analysis we used MSigDB v7.5⁷¹ and applied Fisher exact test with FDR correction for multiple testing to find significant overlap. All raw and processed data have been submitted on GEO NCBI database with the accession number GSExxxx.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, version 9.0 for Windows). Data were checked for normal distribution. All values are reported as mean \pm SEM. For all experiments, the difference between two groups was assessed by the unpaired two-tailed Student's t test (mann-whitney test). The difference between at least three groups was assessed with a one-way analysis of variance supplemented by Tukey's least significant difference post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at p values < 0.05 .

Butyrate, a bacterial metabolite modulates vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension.

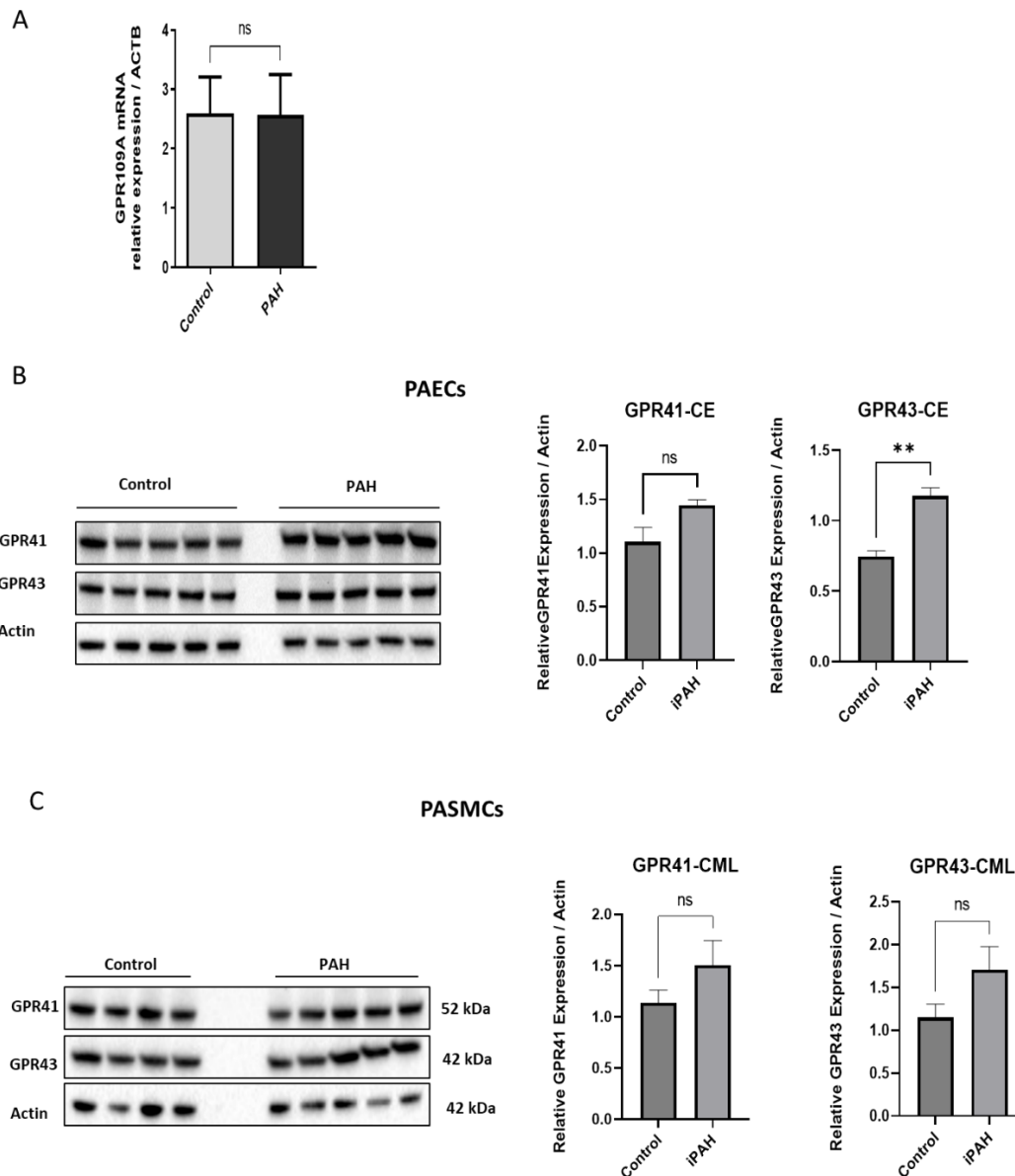
Kouamé Firmin AKOUMIA^{1,2}, Lucille PENALVA MOUSSET^{1,2}, Julien GRYNBLAT^{1,2}, Florent DUMONT^{1,2}, Fabrice ANTIGNY^{1,2}, Maria Rosa GHINIA^{1,2,7}, Elie FADEL^{1,2}, Geneviève HERY-ARNAUD⁵, Nicolas LAPAQUE³, David MONTANI^{1,2,4}, Marc HUMBERT^{1,2,4}, Frédéric PERROS^{1,2}, Sylvia COHEN-KAMINSKY^{1,2}

1. INSERM UMR_S 999 « Hypertension Pulmonaire Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.
2. Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, France.
3. Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Univ. Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France
4. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.
5. Inserm UMR 1078, Université de Bretagne Occidentale, UFR de Médecine, Brest, France
6. Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France.
7. Department of Pathology, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis-Robinson, France.

*These authors contributed equally to the work

Corresponding author: Sylvia Cohen-Kaminsky, INSERM UMR_S999, Hôpital Marie Lannelongue, 133 Avenue de la Résistance, F92350 Le Plessis Robinson, France. sylvia.cohen-kaminsky@universite-paris-saclay.fr

Supplementary Fig.1



Supp. Figure 1: Butyrate and its receptors are dysregulated in the lung and vascular cells of PAH patients. (n = 5 control, 5 iPAH). **(A)** Quantitative RT-qPCR analysis of *GPR109A* gene expression relative to *ACTB* gene expression on total RNA from lung tissue from control and iPAH patients. **(B)** Western blot of GPR41 and GPR43 in PAECs from control and iPAH patients. Left set: Image of western blot. Right set: western blot quantification. Values are GPR41 or GPR42 to *ACTB* signal intensities. **(C)** Western blot of GPR41 and GPR43 in PASMCs from control and iPAH patients. Left set: Image of western blot. Right set: western blot quantification. Values are GPR41 or GPR42 to *ACTB* signal intensities. Two-tailed unpaired Student's t-tests (Mann-Whitney test) assessed the difference between two groups. ns = not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

Supplementary Fig.5

A

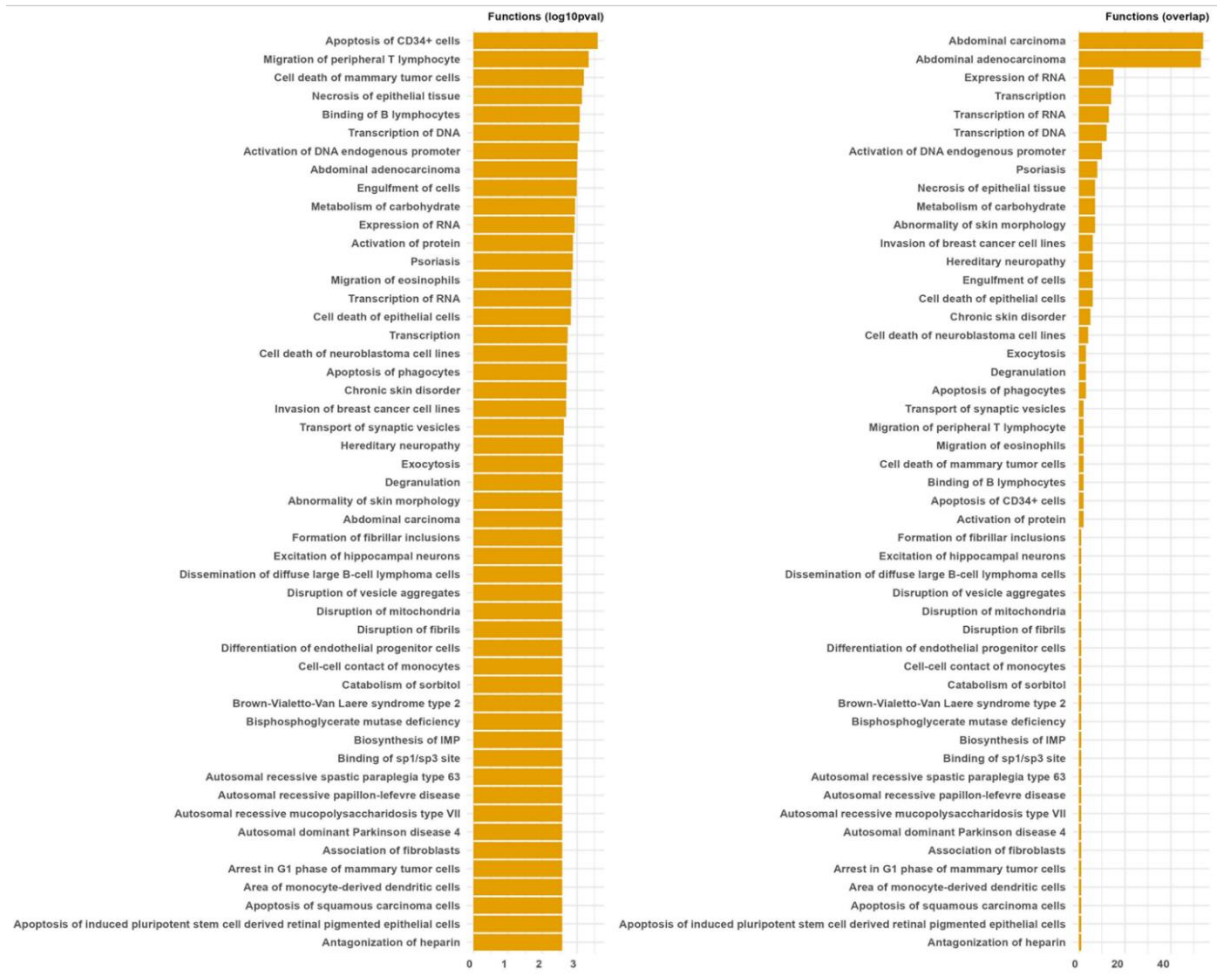
Symbol	p_MCTvsCTRL	fc_MCTvsCTRL	p_MCTBUvsMCT	fc_MCTBUvsMCT
Mapk12	1,21889E-07	-1,642061696	0,03826741	1,200609106
Sox15	5,84095E-07	-1,950811772	0,03638825	1,309136678
Igfbp3	0,000108874	-1,855546514	0,026798592	1,434854972
Cux2	0,000124205	-2,19310986	0,037773754	1,549545023
Carmil3	0,000183195	-1,67677148	0,005491597	1,472474022
Bpgm	0,000276686	-1,238298534	0,013770423	1,158921099
Tada2a	0,000322778	-1,23222304	0,039789428	1,132225658
Snca	0,000354605	-2,848362308	0,037914208	1,882193779
Rec114	0,000669	-2,196271638	0,001968974	2,072164491
Fam71e1	0,000882749	-1,498662074	0,047264885	1,289195249
Klb	0,002390268	-2,030918365	0,038173676	1,660977282
Tulp3	0,007239572	-1,115306318	0,024676618	1,099263113
Mroh7	0,007580212	-1,490368065	0,041438879	1,37677178
Jun	0,017808156	-1,250666094	0,019472707	1,25332082
Has3	0,018448695	-1,500232915	0,033933817	1,458925988
Errfi1	0,018661368	-1,383288106	0,020847738	1,386065664
Bbs7	0,02250863	-1,142279604	0,035496665	1,134928105

B

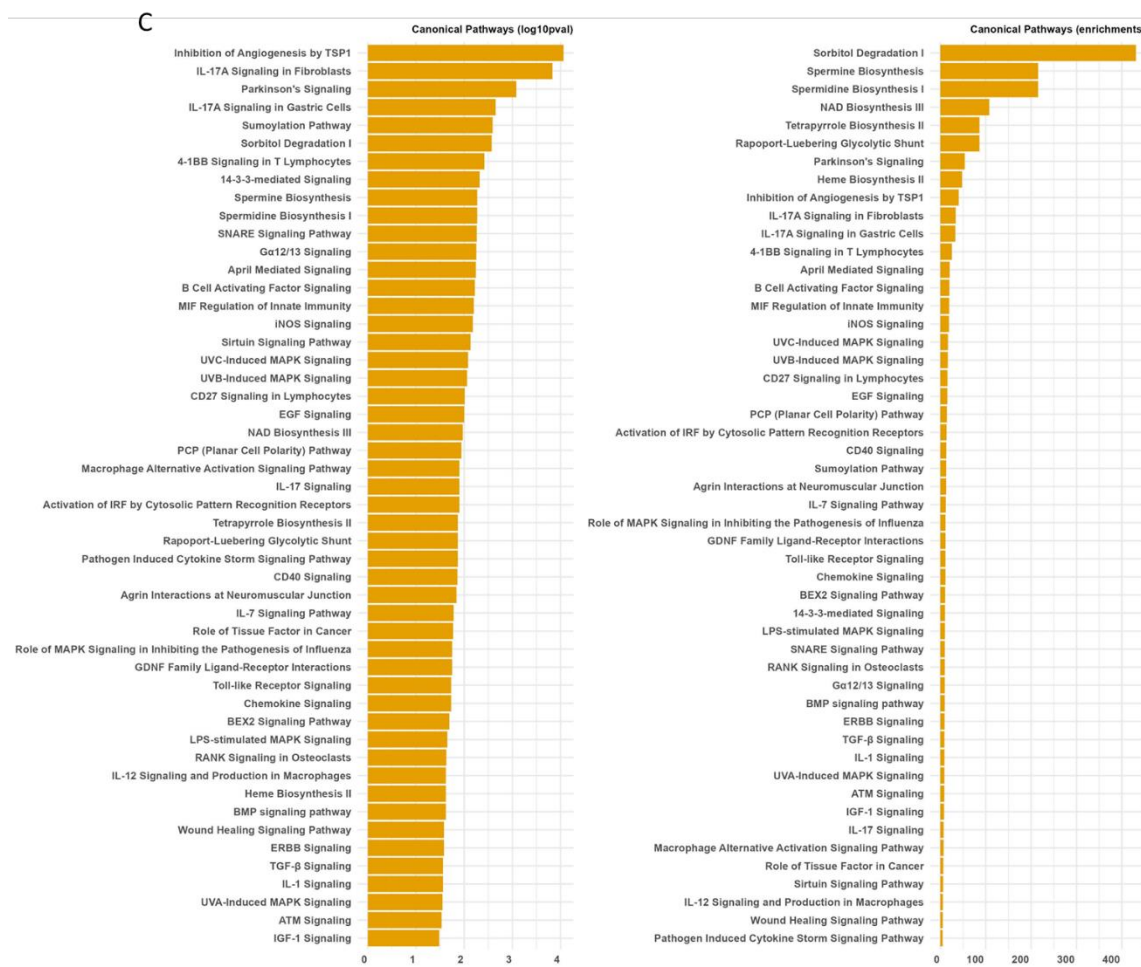
Symbol	p_MCTvsCTRL	fc_MCTvsCTRL	p_MCTBUvsMCT	fc_MCTBUvsMCT
Mmp25	2.47249443141584e-09	1.97703317960527	0.0102655174977914	-1.28878453814866
Amd1	2.56853338598262e-09	1.49880652827526	0.0348204025353654	-1.1347892539169
Gusb	1.81351925698792e-08	1.47196411461828	0.0263411913315712	-1.14809953877898
Rab27a	1.91780695546484e-07	1.40271232715968	0.0185251858341166	-1.15364546262419
Ly6i	3.02460989143327e-07	2.82182300559868	0.0309215898490576	-1.51429874107123
Pf4	5.81359221096811e-07	1.80336134133631	0.0445073408415222	-1.25794250530295
Vps26a	1.80991214016046e-06	1.1164039752854	0.00753041761421391	-1.06073853909958
Slc52a2	2.80958657716823e-06	1.24206477763827	0.0149707865535393	-1.11516907141856
Ctsc	0.000277231965690294	1.2814436321247	0.0226858133820561	-1.17288091307616
Fbxo4	0.00121172311331941	1.17744737669039	0.0497639954006158	-1.11021540844615
Ppt1	0.00144028446755906	1.20825502936471	0.0177800786801924	-1.15628203261744
Rhbg	0.00241909424048292	1.52435604827417	0.041647447873421	-1.34685378043825
Eef1akmt1	0.00266707170058234	1.1146235187763	0.0380841383320158	-1.08178933209986
Med10	0.00466988824397152	1.12179472828483	0.00524505758148563	-1.12299147242193
Cenpl	0.00575071957119333	1.17620280270741	0.00349605892870575	-1.19159578395932
Stard5	0.00656079702557377	1.15304968178916	0.0469450138930217	-1.1159612191255
Clta	0.0109908360859219	1.10671595985748	0.0493755999457038	-1.08595129073272
Rpl31	0.0141642849572828	1.12561165086753	0.0366866615326833	-1.11052834159856
Sord	0.0221018378530349	1.14711696319422	0.0388515145821831	-1.13684598565161
Tram1	0.0251056463477304	1.07221186125798	0.0377678293053455	-1.06902023887433
Hmbs	0.0252927384498706	1.09683955146331	0.0328277730062048	-1.09491907320151
Pla2g15	0.0261521624116402	1.19708312282178	0.023267074060042	-1.20592003303743
Bub3	0.0314417086549502	1.06207305633566	0.0456245363653125	-1.05949098467863
Exo5	0.0343592515072841	1.1349608238721	0.049769458946331	-1.12899523250103
P2ry1	0.0366499122171074	1.21266684127696	0.0381468961659803	-1.21630827808146

Supplementary Fig. 5

D



Supplementary Fig.5



Supp. Figure 1: RNAseq results and genes regulated by NaBu treatment.

(A) List of genes whose expression is up-regulated by butyrate treatment. (B) List of genes decreased by butyrate treatments. (C) Signaling pathways regulated by butyrate. (D) Biological functions regulated by butyrate

DISCUSSION

DISCUSSION GENERALE

I. IMPACT DU MICROBIOTE SUR LA STRUCTURE PULMONAIRE POST-NATALE ET L'ARBRE VASCULAIRE PULMONAIRE

Les progrès scientifiques et technologiques ainsi que les logiciels et bases de données bio-informatiques ont permis d'affirmer que le poumon n'est pas un organe stérile comme cela a été pensé pendant longtemps. Les études qui ont suivi cette découverte ont mis en évidence que la santé humaine dépend directement des écosystèmes microbiens qui font partie intégrante de notre corps, tels que le microbiote intestinal et pulmonaire. De nombreuses preuves établissent un lien entre les profils des communautés microbiennes et diverses maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme, la broncho-pneumopathie obstructive chronique ou BPCO, la fibrose pulmonaire idiopathique et la mucoviscidose ⁴⁴⁵. Ces études suggèrent qu'une augmentation de la charge bactérienne et / ou de l'abondance de bactéries potentiellement pathogènes dans le poumon pourrait entraîner la progression et la mortalité de ces maladies respiratoires. Cependant, bien que le microbiote pulmonaire présente un potentiel en médecine respiratoire, il n'est pas encore pris en compte dans l'HTAP. En effet, les métabolites issus d'espèces présentes dans le poumon pathologique pourraient jouer un rôle dans le remodelage vasculaire pulmonaire et l'HTAP à travers des mécanismes qui ne sont pas encore bien élucidés. De nombreuses questions sont sans réponse claire concernant, d'une part, l'influence du microbiote, pris au sens large, au cours du développement pulmonaire et d'autre part, l'influence des espèces bactériennes et leurs métabolites sur le processus de remodelage vasculaire et le développement de l'HTAP. En somme, des modifications de la composition du microbiome pulmonaire se produisent-elles chez les patients atteints d'HTAP et dans les modèles animaux d'HTAP ? Et si tel est le cas, quel serait alors la conséquence de ces modifications dans l'exacerbation de l'HTAP et le bien-être des patients ? Et par quels mécanismes le butyrate, un métabolite bactérien connu pour être protecteur, du moins dans l'intestin, pourrait inverser le remodelage vasculaire et l'HTAP expérimentale et l'HTAP ?

Nous avons montré, à travers un premier travail, la présence de nombreuses anomalies pulmonaires structurales chez les rats axéniques en postnatal. Nous avons observé une augmentation de l'épaisseur des parois septales et alvéolaires, associée à une augmentation de la cellularité interstitielle et une réduction du nombre d'alvéoles chez les rats axéniques entre le premier et le septième jour par rapport aux rats conventionnels. Les rats axéniques présentaient également des alvéoles collapsées. Ces anomalies se sont atténuées à partir du jour 14 après la

naissance jusqu'au jour 28. Ces alvéoles anormales avec un épaissement de la paroi alvéolaire dû à l'infiltration cellulaire pourraient générer une hypoxie et expliquer l'augmentation de l'expression protéique de HIF-1 alpha chez les rats axéniques dans nos études. Des anomalies similaires caractérisées par un développement alvéolaire altéré, avec des cloisons hypercellulaires épaisses, une augmentation du collagène et de α -SMA, ainsi qu'un développement vasculaire anormal ont été observés chez des souris nouveau-nées qui surexpriment conditionnellement TGF- β 1⁴⁴⁶. Il est connu que la voie TGF- β est dérégulée chez les patients HTAP¹²⁵ et est importante dans le remodelage vasculaire pulmonaire⁴⁴⁷. Une inhibition du développement alvéolaire et une augmentation du TGF- β dans le LBA ont été observées chez des rats exposés à l'hypoxie au cours des 2 premières semaines de vie mais pas à l'âge adulte⁴⁴⁸. En effet, l'hypoxie chronique inhibe de manière permanente le développement alvéolaire chez les animaux au cours de la septation alvéolaire postnatale et entraîne un remodelage artériel pulmonaire anormal chez les nouveau-nés et les nourrissons, contribuant ainsi à la pathogenèse de l'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né⁴⁴⁹ et de la dysplasie bronchopulmonaire⁴⁵⁰. Des études ont indiqué que TGF- β est induit par des micro-organismes tels que *Clostridium*, *Bacteroides* et *Enterobacteriaceae*^{451,452}. Ainsi, le butyrate principalement dérivé de *Clostridia* induit la libération de TGF- β ⁴⁵³ à partir de l'épithélium intestinal et la différenciation des Treg^{454,455}. Une autre étude a montré que l'administration de *Clostridium butyricum* en tant que probiotique⁴⁵⁶ a favorisé la différenciation des Treg par le TGF- β 1 de manière dépendante de la voie TGF- β -Smad et TLR-ERK-AP1⁴⁵⁷. Cependant, l'expression de TGF β 1 est significativement diminuée dans le côlon des souris sans germes par rapport aux souris colonisées^{458,459}. Néanmoins, vue l'importance de cette voie dans le processus de remodelage, il serait intéressant de l'étudier dans les modèles d'HTP induites chez les rats axéniques.

Ces observations nous ont poussé à émettre plusieurs hypothèses. Dans un premier temps, nous avons pensé que l'aspect collapsé des alvéoles avec des cloisons plus épaisses chez les rats axéniques pourrait être dû à un déficit de surfactant. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une pathologie caractérisée par des lésions de l'endothélium capillaire et de l'épithélium alvéolaire, avec un rôle important des cellules alvéolaires de type I et II qui produisent le surfactant. Des études ont montré que les nourrissons prématurés ont des poumons immatures qui produisent une quantité insuffisante de surfactant pour diminuer la tension superficielle entre l'air et les alvéoles et sont plus susceptibles de développer un SDRA⁴⁶⁰. Aussi, l'infection chronique des poumons par *Pseudomonas aeruginosa* touche plus de 80 % des adultes atteints de mucoviscidose. Il a été observé que la composition et la quantité de

surfactant sont modifiées dans le LBA des patients atteints de mucoviscidose et cette modification est régulée par *Pseudomonas aeruginosa* via l'élastase qui dégrade les protéines A et D (SP-A et SP-D) du surfactant⁴⁶¹, montrant le rôle du microbiote.

Par faute d'anticorps anti-surfactant chez le rat, nous n'avons pas pu valider cette hypothèse. Il serait donc intéressant de creuser un peu plus cette voie pour mieux comprendre le rôle que pourrait jouer l'absence de microbiote dans la régulation de cette protéine importante. Dans un second temps, nous nous sommes interrogés sur la nature des cellules interstitielles infiltrantes. La caractérisation de celles-ci a permis de mettre en évidence, à l'aide de marquages CD45, CD3 et CD20, des cellules infiltrantes de types lymphoïde T, B et myéloïde qui se sont réorganisées en foyers ressemblant à des structures lymphoïdes tertiaires à partir du 14^e jour, suggérant une réponse immunitaire à un auto-antigène local dans le poumon des rats axéniques. Cela reste une hypothèse à explorer.

En plus de ces résultats, l'analyse immunohistochimique utilisant Ki-67 a révélé une augmentation significative proliférante parmi les cellules infiltrantes, dans les vaisseaux, les bronches et les septa alvéolaires, accompagnée d'une augmentation significative de l'expression de PCNA chez les rats axéniques. Ces phénomènes se sont accompagnés d'une augmentation significative de l'expression protéique du facteur 1-alpha inductible à l'hypoxie (Hif-1 α) chez les rats axéniques jusqu'au 3^e jour, suggérant une hypoxie suite à une réduction de la surface d'échange gazeux chez les rats axéniques.

Il est admis que certains métabolites bactériens tels que le butyrate, le propionate et l'acétate contribuent à l'activation de HIF-1 α ⁴⁶² qui aggrave la réponse immunitaire et la fibrose pulmonaire obstructive chronique chez la souris, entraînant une augmentation des infiltrats pulmonaires et des lésions tissulaires^{463,464}. Cependant, cette augmentation de HIF-1 α en absence de bactéries chez les rats axéniques, dans notre étude, pourrait donc être due à d'autres mécanismes. En effet, l'augmentation de la température corporelle à près de 41 °C entraîne l'accumulation de HIF-1 α dans les reins et le foie et cela pendant des heures⁴⁶⁵. Cela reste une hypothèse à vérifier par rapport aux conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les incubateurs ayant hébergés les rats axéniques. Les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL6, IL-1 β , IL12, NF-kB et Cox2 induisent également la surexpression de HIF-1 α qui à son tour joue un rôle important dans l'immunité en améliorant l'adaptation des cellules à de nouvelles conditions⁴⁶⁶. HIF-1 α est fortement augmenté dans les poumons de patients BPCO et est corrélé à l'inflammation et aux changements structurels de l'épithélium alvéolaire et bronchique dans le développement de cette maladie⁴⁶⁷. Il est aussi démontré que l'activation des récepteurs des lymphocytes T entraîne une production accrue de HIF-1 α ⁴⁶⁸ qui à son tour

peut induire un profil glycolytique et une augmentation de la migration des lymphocytes T CD8⁺ ⁴⁶⁹. La suppression de HIF-1 α induit une infiltration de lymphocytes B et accélérerait la progression du cancer du pancréas ⁴⁷⁰. Au vue de ces différents éléments, nous pouvons suggérer que l'augmentation transitoire de HIF-1 α que nous avons observée chez les rats axéniques pourrait être due à l'afflux de cellules infiltrantes inflammatoires et proliférantes ainsi que les anomalies alvéolaires observés chez les rats axéniques. Elle pourrait également être initiée pour soutenir la réponse immunitaire observée chez les rats axéniques. Des études plus approfondies sont donc nécessaires pour comprendre le rôle de cette augmentation transitoire de HIF-1 α .

L'inflammation chronique est une signature de plus en plus reconnue de l'HTAP. Elle est importante pour l'initiation et le maintien du remodelage vasculaire. Des niveaux élevés de plusieurs médiateurs de l'inflammation ont été observés chez les patients atteints d'HTAP et dans des modèles expérimentaux d'HTAP ⁴⁷¹. De même, plusieurs types de cellules immunitaires (principalement des lymphocytes T et B, des macrophages, des mastocytes) sont retrouvés à l'intérieur et autour de la paroi des vaisseaux pulmonaires remodelés ainsi qu'à proximité des lésions plexiformes ⁴⁷². Les lymphocytes T jouent un rôle important à la fois dans l'immunité cellulaire et dans la pathogenèse de l'HTAP par l'induction de réponses inflammatoires et auto-immunes en produisant de l'interleukine (IL)-6, de l'IL-2, de l'IL-21, de l'interféron- γ et du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) ⁴⁷². En effet, il a été démontré que les cellules Th17 (sous-types de cellules T auxiliaires), favorisent la progression de l'HTAP induite par l'hypoxie chez le rat en sécrétant de l'IL-17A, alors que l'inhibition des cellules Th17 atténue significativement l'augmentation de la pression et le remodelage vasculaire induits par l'hypoxie chronique ⁴⁷³.

Les lymphocytes B sont primordiaux pour la réponse immunitaire humorale et jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de l'HTAP, non seulement en se transformant en plasmocytes produisant des auto-anticorps, mais aussi en jouant un rôle crucial dans la régulation immunitaire à médiation cellulaire via la présentation des antigènes, la production de cytokines, la différenciation des lymphocytes T effecteurs et la collaboration avec des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes ⁴⁷⁴. Des études ont rapporté que les rats déficients en lymphocytes B sont moins sensibles à l'HTAP sévère et au remodelage vasculaire pulmonaire induit par la MCT ou l'hypoxie ⁴⁷⁵. Lors d'un essai clinique avec le rituximab, un anticorps ciblant les lymphocytes B, a montré une innocuité et une efficacité dans le traitement de l'HTAP associée sclérodémie systémique ⁴⁷⁶. Les macrophages jouent un rôle très important dans le processus pathologique de l'HTAP et pourraient provoquer une fibrose vasculaire pulmonaire. Des améliorations des

symptômes pathologiques de l'HTAP ont été constatées dans des modèles animaux suite à une réduction du nombre de macrophages ou l'inhibition de leur fonction⁴⁷⁷. Dans notre étude, nous avons mise en évidence la présence de cellules infiltrantes de types lymphoïde T, B et myéloïde qui se sont réorganisées en foyers ressemblant à des structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Des travaux sur les troubles inflammatoires chroniques et les maladies auto-immunes suggèrent que des anticorps pathogènes et des lymphocytes T peuvent également être générés localement, dans l'organe ciblé, dans des follicules lymphoïdes ectopiques hautement organisés communément appelés tissus lymphoïdes tertiaires⁴⁷⁸. Une accumulation de lymphocytes dans des structures lymphoïdes hautement organisées dans les poumons de patients atteints d'HTAPi a été décrite, suggérant une néogénèse lymphoïde⁴⁷⁹. Le remodelage vasculaire pulmonaire et l'hypertension pulmonaire induite par la MCT sont associés à un dysfonctionnement immunitaire et à l'auto-immunité^{480,481}. En plus, nous avons montré une augmentation de cellules positives à KI-67 chez les rats axéniques. Il a été démontré que Ki-67 est impliqué dans le développement et la fonction des centres germinatifs, ainsi que dans l'auto-immunité⁴⁷⁹.

Dans ce premier chapitre, nous avons observé une augmentation significative du nombre d'artérioles muscularisées chez les rats axéniques à des temps précoces après la naissance, ce qui suggère un remodelage vasculaire⁴¹.

Pour conclure sur ce premier chapitre, nous avons constaté que l'absence de microbiote pourrait impacter la fonction et la structure des alvéoles. Elle pourrait également induire une rupture de la barrière provoquant une infiltration de cellules inflammatoires et un dysfonctionnement immunitaire ainsi qu'une muscularisation des artérioles pulmonaires. L'ensemble de ces anomalies pourrait bien poser les maillons d'une dérégulation pouvant contribuer au développement de l'HTAP plus tard.

Pour comprendre les mécanismes régulant ces processus, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'absence de microbiote pourrait exacerber l'HTP induite par la MCT chez le rat. Nous n'avons pas pu réaliser cette étude pour des raisons de non-validation du protocole par le comité d'éthique afin d'obtenir une autorisation à expérimenter.

II. EFFET DU SODIUM BUTYRATE *IN VIVO* ET *IN VITRO* DANS L'HTAP HUMAINE ET DANS LE MODELE D'HTP INDUITE PAR LA MONOCROTALINE CHEZ LE RAT

En parallèle, nous avons initié la cartographie structurale du microbiote du parenchyme pulmonaire de patients HTAP comparés à des témoins afin d'identifier les bactéries et/ou les métabolites bactériens pouvant influencer le développement de la pathologie. Cette étude, pour des raisons techniques (absence de kit d'amplification du matériel génétique, part trop importante de l'ADN d'Eucaryote noyant l'ADN de procaryote) et d'autres paramètres que nous ne maîtrisons pas, ne nous a pas permis d'identifier des communautés bactériennes entre les échantillons de tissus pulmonaires de témoins et de patients HTAP. A notre connaissance, une telle étude n'a pas encore été réalisée dans le cadre de l'HTAP, à partir du parenchyme pulmonaire.

En attendant les résultats de cette étude, nous avons, en nous inspirant de ce qui est connu dans la littérature, nourri l'idée que, si le microbiote influence le développement de l'HTAP, alors cela se ferait probablement par l'intermédiaire de métabolites bactériens. Nous avons alors émis l'hypothèse que le butyrate, un métabolite bactérien, jouant un rôle clé dans les maladies inflammatoires intestinales pourrait être protecteur dans l'HTAP.

Nous avons montré, pour commencer, que les expressions protéiques et géniques de GPR41 et GPR43, deux récepteurs des AGCC, étaient significativement diminuées chez les patients atteints d'HTAPi. Les AGCC activent GPR41 et GPR43 sur les cellules épithéliales intestinales, conduisant à la signalisation de la MAPK et à la production rapide de chimiokines et de cytokines, régulant l'immunité protectrice et l'inflammation des tissus chez la souris ⁴⁸². Dans cette étude l'expression des médiateurs clés des réponses inflammatoires, y compris les chimiokines et les cytokines, était dérégulée en l'absence de GPR41 et GPR43. Plusieurs études ont montré que les CEs expriment à la fois GPR41 et GPR43 à des niveaux élevés ⁴⁸³. Par ailleurs, l'absence de GPR41 chez les souris knock-out a été liée à une pression artérielle systémique plus élevée et à un indice d'hypertrophie cardiaque gauche plus élevé ⁴⁸⁴. Il serait donc intéressant de déterminer si les récepteurs des AGCC sont impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP. La diminution des récepteurs GPR41 et GPR43 dans les poumons de patients HTAP, suggère une hypo-fonction de ces récepteurs et une diminution de la signalisation due au butyrate chez les patients.

C'est pourquoi nous avons recherché les effets du butyrate *in vitro* dans les processus cellulaires associés au remodelage vasculaire et *in vivo* dans un modèle animal d'HTAP.

La prolifération et la migration des CML-AP contribuent à l'obstruction de la lumière des AP et participe à l'augmentation de la pression artérielle dans l'HTAP. Des facteurs de croissance tels que le PDGF, l'EGF ou le NGF sont impliqués dans ces processus de prolifération et de migration anormales des CML-AP³⁴. Nous avons montré que le NaBu inhibe la prolifération et la migration dépendante du PDGF dans les CML-AP. Des effets similaires du butyrate caractérisés par une inhibition de la prolifération et la migration ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire ont été démontrés dans les CML⁴⁸⁵. Le butyrate inhibe la prolifération des cellules épithéliales intestinales isolées de cancers, cependant, des expériences réalisées sur des lignées cellulaires non tumorales ont montré que le butyrate stimulait la prolifération et inhibait la différenciation⁴⁸⁶. Ce phénomène d'effets opposés du butyrate sur les colonocytes sains et cancéreux a été surnommé « le paradoxe du butyrate »⁴⁸⁶. Plusieurs phénomènes peuvent aider dans la compréhension de ce paradoxe. Premièrement, cela peut être dû aux différences entre les types cellulaires, à leur état d'activation et leur potentiel énergétique. Deuxièmement, cela peut être dû aux différentes concentrations de butyrate et aux différents temps d'exposition utilisés dans ces expériences. Enfin, cela pourrait être dû au rôle joué par le butyrate dans l'épigénétique. En effet, les colonocytes sains utilisent le butyrate comme source d'énergie, et donc il est rapidement métabolisé et n'a pas le temps d'inhiber les HDAC pour déclencher l'inhibition de la prolifération dans ce type cellulaire⁴⁸⁷. Cependant, de tels phénomènes du butyrate ne sont pas décrits dans le système vasculaire à notre connaissance.

L'inflammation, avec son afflux de cellules pro-inflammatoires initie et entretient le remodelage vasculaire décrit dans l'HTAP. Nous avons montré que le butyrate inhibe l'inflammation dans les CML-AP et dans le modèle expérimental. Les médiateurs de l'inflammation sont des acteurs cruciaux du remodelage vasculaire. Il a été suggéré que les chimiokines et cytokines sécrétées par les cellules vasculaires pulmonaires dérégulées vont recruter à leur tour des cellules inflammatoires et des cellules immunitaires qui, face à la résistance à l'apoptose vont contribuer au remodelage et à l'obstruction du lit pulmonaire¹⁸⁸. Les résultats des travaux sont mitigés concernant les rôles des AGCC dans la régulation de l'inflammation chronique de l'intestin. Certains ont rapporté que l'administration de butyrate augmentait l'expression intestinale de l'IL-1 β et de l'IL-6, contribuant ainsi à l'induction de l'inflammation⁴⁸⁸. Et d'autres ont montré que le butyrate inhibe l'inflammation intestinale en particulier dans les maladies inflammatoires de l'intestin³⁸⁵. Là encore, le paradoxe du butyrate refait surface. Bien que nous ayons un certain niveau de preuves montrant l'effet protecteur du butyrate dans le système vasculaire pulmonaire, seuls des essais chez les patients HTAP en combinaison avec les standards de traitement permettront de trancher la question.

Le NO est un puissant vasodilatateur. Dans le tissu vasculaire, il peut être libéré par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules constituant l'innervation péri-vasculaire. L'altération de la voie du NO dans l'endothélium pulmonaire entraîne une augmentation du tonus des muscles lisses vasculaires ainsi qu'un remodelage vasculaire, et contribue au développement et à la progression de l'HTAP¹⁷⁸. Nous avons montré que NaBu induit la relaxation dans les artères pulmonaires de rats témoins pré-contractées avec de l'U46619 (un mimétique du thromboxane A2) montrant ainsi les propriétés vasodilatatrices du NaBu. Des études ont démontré une amélioration de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans l'hypertension systémique après modulation du microbiome intestinal avec des agents probiotiques producteurs d'AGCC⁴⁸⁹. Les traitements actuels de l'HTAP sont essentiellement des vasodilatateurs. Il serait donc intéressant d'étudier de manière plus approfondie, le potentiel thérapeutique du butyrate seul ou en association avec d'autres traitements existants dans le modèle animal. Chez les patients, seule la combinaison avec les standards de traitement pourra être évaluée pour des raisons éthiques.

Dans le modèle d'HTP induite par la MCT, nous avons montré que le NaBu améliore les paramètres hémodynamiques en empêchant l'augmentation de la pression systolique du ventricule droit (RVSP) et de l'hypertrophie du ventricule droit. Le traitement a également empêché l'effondrement du débit cardiaque (CO) associé à une diminution de la résistance vasculaire pulmonaire (PVR). Des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle d'hypoxie chez des rats Sprague Dawley dans un protocole préventif. Cependant, le butyrate n'a pas pu inverser le développement de l'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chez ces rats lorsqu'il a été administré dans un protocole curatif après deux et quatre semaines d'exposition hypoxique⁴⁹⁰. D'autres études ont rapporté que des dérivés du butyrate, notamment l'acide 4-phénylbutyrique (4-PBA) induit une protection contre l'HTP chez le rat dans le modèle hypoxique⁴⁹¹ et dans le modèle MCT⁴⁹². L'analyse du remodelage vasculaire pulmonaire a montré que les rats malades présentaient un remodelage de la paroi artérielle avec une muscularisation accrue des artères de petit calibre ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la paroi. Le traitement préventif au NaBu a réduit l'épaississement des parois des vaisseaux et la capacité de néo-muscularisation des petits vaisseaux pulmonaires par la diminution du nombre de vaisseaux muscularisés chez les rats traités au NaBu. Des résultats similaires ont été obtenus dans des études réalisées dans les modèles MCT et hypoxique démontrant la capacité du butyrate et certains de ses dérivés à réduire le remodelage vasculaire pulmonaire^{490,493}.

L'étude des marqueurs de l'inflammation dans les lysats de tissus pulmonaires a montré une régulation à la hausse induite par la MCT de l'expression génique de l'IL6 et l'expression

protéique de Cox-2, une cyclooxygénase induite pendant l'inflammation et participant à la production de prostaglandine PGE2 à partir de l'acide arachidonique. Le traitement au NaBu a réduit de manière significative l'expression protéique de Cox2 et l'expression génique de l'IL-6. Ces résultats sont en accord avec une étude montrant que le NaBu atténue l'hypertrophie cardiaque induite par l'angiotensine II en inhibant la voie COX2/PGE2 via un mécanisme dépendant de HDAC5 et HDAC6 ⁴⁹⁴. Nous avons montré également que NaBu a diminué l'expression de deux facteurs de transcription impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique (stress du RE). En effet, les expressions protéiques de CHOP et de ATF4, augmentées chez les rats MCT sont diminuées significativement lorsque les rats sont traités avec le NaBu. Le stress du RE est régulé par trois voies bien distinctes. Ce sont la voie PERK avec CHOP et ATF4, la voie IRE1 avec sXBP1 et la voie ATF6 ⁴⁹⁵. Le stress du RE joue un rôle dans la physiopathologie de l'HTAP. Sa réduction par le 4-PBA empêche le développement de l'HTP induite par l'hypoxie chez le rat ⁴⁹¹. Il a été rapporté que NaBu réduit le stress du RE en modulant CHOP et renforce le métabolisme immunitaire anti-inflammatoire dans un modèle de souris obèses ⁴⁹⁶. Ces résultats suggèrent que le NaBu pourrait empêcher le développement de l'HTAP expérimentale en inhibant le stress du RE par la voie de signalisation PERK/CHOP/ATF4.

Plusieurs mécanismes participent à la mise en place du remodelage vasculaire et à son entretien. Parmi ces mécanismes, l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire (MEC), notamment les collagènes I, III et V, la fibronectine, la ténascine et le biglycane produits par les fibroblastes, participent au remodelage ⁴⁹⁷. Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont une famille d'enzymes protéolytiques dépendantes du zinc et sont connues pour leur capacité de régulation de la MEC en la dégradant ⁴⁹⁸. Les MMP, impliquées dans la modification de la MEC sont peu exprimées dans les tissus sains. Cependant, leur expression augmente lors des processus de remodelage tissulaire. En effet, dans certaines pathologies respiratoires, les cellules inflammatoires telles que les macrophages, les éosinophiles, les leucocytes et les cellules de structures telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes sécrètent des MMP dans les voies respiratoires ^{499,500}. En plus de cela, des niveaux plasmatiques élevés de MMP-2 sont corrélés à un mauvais pronostic dans l'HTAP chez l'homme ⁵⁰¹ et l'activation de la MMP-9 favorise l'invasion et la migration cellulaire dans le cancer gastrique. Nos résultats ont montré une augmentation de la MMP-2 ⁵⁰² chez les rats MCT. Le traitement au NaBu a réduit de manière significative l'expression protéique de la MMP2, suggérant que le butyrate limite l'invasion et la migration cellulaire dans le modèle MCT. Des résultats similaires ont été

obtenus dans un modèle d'asthme allergique induit chez la souris. Les auteurs ont montré que NaBu inhibe la MMP-2 et la MMP-9 empêchant ainsi la progression de la maladie ⁵⁰².

Cependant, l'activité des protéases décrites plus haut peut être inhibée par les antiprotéases qui représentent une large classe de protéines pouvant moduler les réponses immunitaires dans les poumons ⁵⁰³. En effet, les antiprotéases respiratoires sont composées de quatre familles : les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP), les inhibiteurs de la sérine protéase (serpines), la trappine-2 et les inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire (SLPI) ^{503,504}. Ils inhibent l'inflammation, protègent contre le développement de maladies respiratoires chroniques et bloquent les infections microbiennes ⁵⁰³⁻⁵⁰⁵. Dans le poumon sain, bien qu'il existe de nombreux types de protéases et d'antiprotéases exprimées, un équilibre entre protéases et antiprotéases s'établit pour assurer l'homéostasie respiratoire. L'équilibre dépendra de la présence globale, du moment de la production et/ou de la libération de la protéase et de l'antiprotéase et de l'activité. Une modification de l'équilibre vers une expression et une activité accrues de la protéase peut entraîner une inflammation manifeste et le développement de troubles pulmonaires chroniques tels que la BPCO et l'emphysème ⁵⁰³. En inhibant la signalisation NF- κ B, SLPI modifie l'équilibre de la production de cytokines cellulaires en supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires ⁵⁰⁵.

Nous avons conforté *in vivo*, dans le modèle d'HTP induite par la MCT, les effets protecteurs du butyrate observés *in vitro* et apporté des arguments permettant de considérer le butyrate comme agent thérapeutique dans le traitement de l'HTAP.

Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons réalisé une étude RNAseq pour identifier les cibles potentielles du butyrate dans le modèle d'HTP induite par la MCT chez le rat. Dans cette étude, nous avons mis en évidence 17 gènes régulés à la hausse et 25 gènes régulés à la baisse chez le rat traité au NaBu en comparaison aux rats MCT non traités. L'analyse d'enrichissement a permis d'identifier les 50 principales voies régulées par le butyrate, telles que la signalisation de l'IL-17A, l'activation des cellules B, la signalisation du CD27 et du TLR. Ces gènes différentiellement exprimés ont été associés à des fonctions telles que la régulation de l'apoptose, la différenciation des cellules progénitrices endothéliales, l'arrêt du cycle cellulaire, etc. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux gènes dont l'expression est diminuée chez les rats MCT et augmentée avec le traitement au butyrate tels que Jun, CUX2, Has3, Sox15, Snca, etc. Des études ont montré que la surexpression de CUX2 a réprimé les capacités de prolifération, migration et d'invasion des cellules de gliome par l'intermédiaire de ADCY1 ⁵⁰⁶. Ce qui est cohérent avec nos résultats montrant que le butyrate induit l'expression de CUX2. Par ailleurs, des études ont montré que la suppression de CUX2 a inhibé de manière

significative la prolifération, la formation, la migration et l'invasion des lignées cellulaires dans le cancer de la thyroïde et induit la transition épithéliale-mésenchymateuse et influencé la phosphorylation d'AKT et de mTOR dans les voies PI3K-AKT-mTOR ⁵⁰⁷. Il est mentionné aussi que la suppression de CUX2 inhibe KDM5B pour réprimer la progression du cancer du sein en surexprimant SOX17 ⁵⁰⁸.

Nous avons montré que Has3 est augmenté chez les rats traités au NaBu comparés aux rats MCT. Has3 est essentiel pour la matrice extracellulaire et régule l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire et il est rapporté que sa surexpression régule à la baisse la prolifération, la migration et l'adhérence des cellules du mélanome ⁵⁰⁹. Ces résultats confirment le rôle du butyrate dans l'inhibition de la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux gènes dont l'expression est augmentée chez les rats malades et diminuée avec le traitement au NaBu tels que GUSB, MMP25, P2ry1, etc. L'étude RNAseq a montré que le traitement au butyrate diminue l'expression de la β -glucuronidase (GUSB). Des études ont montré que le blocage de GUSB inhibe la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses en régulant à la hausse l'expression de PD-L1 ⁵¹⁰ et améliorerait l'efficacité des médicaments anticancéreux ⁵¹¹. Comme nous l'avons observé avec l'étude de l'expression protéique de MMP2, le niveau de MMP25 est également diminué chez rats traités au butyrate dans l'étude RNAseq.

Cette étude RNAseq nous a permis d'identifier quelques gènes qui seraient régulés par le butyrate pour assurer son rôle protecteur dans le modèle d'HTP induite par la MCT chez le rat. Il serait donc intéressant de mesurer les expressions géniques et protéiques de ces cibles du butyrate dans le tissu pulmonaire et les cellules vasculaires pulmonaires de patients HTAP ainsi que dans les différents mécanismes conduisant au remodelage vasculaire pulmonaire.

Au cours de cette thèse nous avons contribué à montrer que le microbiote et certains métabolites bactériens qu'il produit pourraient moduler le développement pulmonaire ainsi que le développement de l'HTAP. Il serait aussi intéressant de porter un regard particulier sur le butyrate qui pourrait être probablement une nouvelle molécule thérapeutique dans le traitement de cette pathologie.

III. ETUDE COMPAREE DU MICROBIOTE INTESTINALE ET DU MICROBIOTE PULMONAIRE DANS LE MODELE D'HTP INDUITE PAR LA MONOCROTALINE CHEZ LE RAT

Nous avons comparé le microbiote intestinal et le microbiote pulmonaire (LBA et parenchyme pulmonaire) dans le modèle d'HTP induite par la MCT chez le rat. Plusieurs études ont montré un lien entre le microbiote et certaines pathologies respiratoires. Des changements fonctionnels du microbiome intestinal telle qu'une augmentation des bactéries productrices de TMA/TMAO pourraient influencer le développement de l'HTAP. En effet, les taxons producteurs de TMA/TMAO (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Citrobacter*, *Collinsella*) étaient significativement élevés dans le microbiome intestinal des patients HTAP⁴¹⁰. L'augmentation de *Collinsella* chez les patients HTAP peut contribuer à la pathogenèse de la maladie en augmentant la perméabilité intestinale par la régulation à la baisse les protéines des jonctions serrées et en favorisant la production d'IL-17A épithéliale^{416,512}. Cette perméabilité intestinale pourrait favoriser le passage d'éléments bactériens ou de métabolites bactériens dans la circulation, pouvant alors agir sur le poumon. La possibilité d'un axe intestin-poumon a été décrit dans les pathologies respiratoires^{513,514}. Il a été rapporté que thrombospondine 1 (THBS1) favorise la vasoconstriction pulmonaire induite par l'hypoxie en activant la voie de signalisation du *TGF-β*⁴¹³. Or dans l'HTAP, il existe un déséquilibre des voies *TGFβ* / *BMPRII* en faveur du *TGFβ* et en régulant un ensemble de gènes caractéristiques de la production de matrice extracellulaire tels que les métalloprotéinases (*MMP7*, *MMP9* et *MMP12*)⁴¹⁴. Nous avons montré que les phyla les plus abondants dans le microbiote des trois niches sont Firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteriota et Proteobacteria. Cependant, les Actinobacteriota n'étaient pas présentes dans l'intestin. Nous avons mis en évidence une séparation nette entre les bactéries intestinales et les bactéries pulmonaires. Au sein des bactéries pulmonaires, il y avait une séparation entre celles provenant du parenchyme et celles issues du LBA. En effet, les communautés bactériennes ont permis de séparer les échantillons en fonction du sites de prélèvement mais également en fonction du statut MCT ou contrôle. Cette observation nous permet de confirmer que le profil des communautés bactériennes dépend du site de prélèvement. Une dysbiose bactérienne a été signalée dans l'HTAP et dans les modèles expérimentaux chez l'animal^{412,418}. Nous avons montré que le rapport Firmicutes/Bacteroidota était augmenté chez les rats MCT dans le microbiote intestinal mais pas dans le microbiote des voies respiratoires inférieures. La diversité alpha est restée inchangée

entre les rats MCT et les rats contrôles quel que soit le site d'échantillonnage. Nos résultats sont en accord avec ceux de Callejo obtenus sur le microbiote intestinal à partir de fèces dans le modèle Sugén/hypoxie ⁴¹⁸. Cependant, une étude a montré que les rats spontanément hypertendus avaient une charge bactérienne, une richesse et une diversité plus faible que les rats témoins ⁴⁹³. Le microbiome intestinal des rats témoins est caractérisé par des familles appartenant à différents phyla alors que celui des rats MCT est dominé par des familles qui appartiennent toutes au phylum des Firmicutes (*Monoglobaceae*, *Oscillospiraceae* et *Clostridiaceae*). Une étude a indiqué que les *Oscillospiraceae* sont augmentées chez les rats MCT, mais diminuées chez les rats hypertendus (induits par l'angiotensine II (AngII)) ⁴⁹³. La diminution de *Oscillospiraceae* chez les rats hypertendus pourrait s'expliquer par le fait que les mécanismes d'action de l'HTP induite par la MCT sont différents de celle induite par l'AngII qui sont axés sur la dysfonction endothéliale se manifestant par d'un déficit de la vasodilatation pulmonaire dépendante de l'endothélium ⁵¹⁵. *Ruminococcus* est un genre de bactéries anaérobiques gram positif de la famille des *Oscillospiraceae* ⁵¹⁶. Certaines bactéries de ce genre telle que *Ruminococcus gnavus* sont connues pour être pro-inflammatoires et leur surabondance est corrélée aux MICI et à l'inflammation intestinale ⁵¹⁷.

Par ailleurs, *Oscillospiraceae* a été identifiée comme une bactérie productrice d'AGCC, donc probablement protectrice ⁵¹⁸. D'autres genres d'*Oscillospiraceae* tels que *Ruminococcus lactaris* sont corrélés négativement avec IL8 ⁵¹⁹. Les constats liés à l'inflammation avec cette famille varient donc en fonction des genres. Notre caractérisation du microbiote est limitée aux familles bactériennes. Il serait donc intéressant d'aller aux genres pour mieux appréhender le rôle des membres de cette famille bactérienne dans le modèle MCT. Nous avons identifié également une abondance de *Lachnospiraceae NK4B4* appartenant à la classe des *Clostridia* chez les rats MCT dans l'étude du microbiote intestinal. Nos résultats sont différents de ceux obtenus dans d'autres études qui ont démontré un manque de *Lachnospiraceae* chez les patients atteints d'HTAP ⁵²⁰ et d'insuffisance cardiaque ⁵²¹. Les *Lachnospiraceae* sont étroitement liées à la production d'AGCC, précisément de butyrate ⁵²² et de propionate et sont donc potentiellement protectrices dans les maladies cardiovasculaires et l'HTAP ⁵²³. Parmi les *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Oribacterium* et *Roseburia*, sont les principaux genres détectés dans l'intestin humain par des analyses métagénomiques ⁵²⁴. Cependant, l'abondance des *Lachnospiraceae* augmente également dans la lumière intestinale de sujets atteints de différentes maladies telles que les maladies métaboliques ^{525,526}, les maladies du foie ⁵²⁷, les maladies rénales ⁵²⁸, etc.

L'analyse multivariée supervisée du microbiote sur la matrice LBA a séparé les rats témoins des rats MCT. Les rats MCT étaient corrélés positivement aux *Bifidobacteriaceae* (Actinobacteriota). Alors que l'analyse multivariée supervisée du microbiote du tissu pulmonaire a séparé les rats témoins des rats malades avec une corrélation positive entre les rats témoins et les *Lachnospiraceae*. Quant aux rats MCT, ils étaient corrélés positivement avec les *Corynebacteriaceae*. La famille des *Corynebacteriaceae* comprend le genre *Corynebacterium*, avec plus de 130 espèces et sous-espèces et sont capables de provoquer de nombreuses infections graves chez les humains et les animaux ⁵²⁹. *Corynebacteriaceae* est un genre dominant du microbiote cutané qui a un impact profond à la fois sur l'immunité et l'inflammation ⁵³⁰. Le retrouver donc dans le microbiote pulmonaire soulève des questionnements sur une possible contamination avec le microbiote cutané.

Nous montrons enfin une augmentation des *Bifidobacteriaceae* chez les rats MCT dans le poumon. Des résultats similaires ont été obtenus dans des études réalisées sur des modèles de rats ^{418,419,531} et dans l'HTAP humaine ⁵²⁰. Des auteurs ont montré une augmentation de l'abondance relative des bactéries productrices d'AGCC (*Lachnospiraceae* et *Bifidobacteriaceae*) et la production d'AGCC, qui se liaient au GPR43 et diminuaient par conséquent la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α), de médiateurs inflammatoires (COX-2, iNOS, PGE2 et NO), et la chimiokine MCP-1 et la production accrue de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) par inhibition des protéines liées à HDAC3/MAPK et de la voie inflammatoire NF- κ B dans la colite induite par le TNBS chez le rat ⁵³². Par ailleurs, d'autres études ont montré une diminution des *Bifidobacteriaceae* dans l'insuffisance cardiaque ⁵²¹ et dans l'HTP ⁴⁹³ et ces bactéries ont généralement été décrites comme des bactéries protectrices car productrices d'AGCC.

Des analyses complémentaires allant jusqu'à la caractérisation des genres ou espèces bactériens sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle des bactéries retrouvées en abondance chez les rats MCT dans les différentes niches que nous avons étudiées au cours de cette thèse et comprendre ainsi leurs implications dans la physiopathologie de l'HTP.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Durant ma thèse, j'ai étudié, dans un premier temps, l'impact du microbiote sur le développement de l'arbre vasculaire pulmonaire en comparant des rats axéniques à des rats conventionnels dans les 28 premiers jours après la naissance. Cette étude a révélé de nombreuses anomalies pulmonaires structurelles chez les rats axéniques. En effet, les rats axéniques présentaient des alvéoles collapsées, des parois alvéolaires et vasculaires épaissies avec un nombre réduit d'alvéoles et une cellularité infiltrante très importante autour des alvéoles et dans les parois des vaisseaux pulmonaires avec la présence de foyers inflammatoires jusqu'au 14^e jour après la naissance. Ces anomalies structurelles pulmonaires précoces s'atténuent, voire, ne sont plus visibles en imagerie à partir du jour 14 après la naissance. Nous avons montré que ces cellules infiltrantes observées chez les rats axéniques 1) avaient une capacité de prolifération 2) qu'elles étaient de nature myéloïde et lymphoïde T et B et 3) quelles se regroupaient en amas majoritairement à proximité des bronches, ressemblant à des structures lymphoïdes tertiaires tissulaires suggérant une réponse immune locale. Dans la mesure où les rats sont dépourvus de microorganismes, il se peut qu'il s'agisse d'une réponse auto-immune locale à un auto-antigène. Les rats axéniques présentaient aussi une augmentation significative du nombre d'artérioles muscularisées jusqu'au jour 3 et se normalisant à partir du jour 7, suggérant un remodelage vasculaire précoce et transitoire. Ces résultats sont à mettre en perspective avec l'augmentation transitoire de HIF-1 α caractéristique d'une hypoxie. L'étude ayant été menée jusqu'au jour 28 après la naissance, et certaines de ces anomalies structurelles tendant à s'atténuer avec le temps, nous ne pouvons pas prédire si elles seraient persistantes avec le temps, cependant, elles pourraient forger le terrain de potentielles maladies respiratoires à l'âge adulte telles que l'HTAP. Les anomalies pulmonaires des rats axéniques décrites dans ce chapitre, apportent les premiers indices d'un rôle du microbiote dans le remodelage vasculaire pulmonaire suggérant que l'absence de microbiote ou une dysbiose pourrait contribuer à la dérégulation du système immunitaire et au développement d'une HTAP. D'autres travaux sont nécessaires pour affiner notre compréhension du rôle du microbiote dans le processus de remodelage afin de déterminer si l'absence de microbiote ou de certaines bactéries et de leurs métabolites pourrait exacerber le développement de la maladie *in vivo*. Il aurait été intéressant de savoir si les rats axéniques sont plus susceptibles au développement de l'hypertension pulmonaire induite par la MCT à l'âge adulte. Il est dommage que je n'aie pas pu réaliser ces expériences à temps pour ma thèse, faute d'avoir obtenu l'autorisation pour cette expérimentation chez l'animal axénique comparé au rat conventionnel.

Nous avons montré dans un second temps que les récepteurs des AGCC sont dérégulés chez les patients HTAPi et que le butyrate, un métabolite exclusivement bactérien, est protecteur dans cette maladie et dans le modèle d'HTP induite par la MCT chez le rat. Le butyrate a à la fois un effet anti-remodelage vasculaire pulmonaire et vasorelaxant, associé à une amélioration des paramètres hémodynamiques et de remodelage cardiaque. Il serait intéressant de le tester en combinaison avec les standard de traitement de l'HTAP, d'abord dans des modèles animaux à la recherche d'une synergie éventuelle, puis pourquoi pas dans le cadre d'un essai clinique contrôlé chez les patients compte tenu de son innocuité en termes d'effets secondaires. Une telle étude serait difficile à financer, car le butyrate est peu cher à produire et son utilisation est peu protégée. Le marché des compléments alimentaires s'est emparé de cet actif. Par exemple les laboratoires PileJe (experts industriels, spécialistes de la phytonutrition, de la micronutrition et des probiotiques) proposent le Butyrate de la gamme Permebiane, formulé pour les personnes souffrant de dysbiose intestinale ou de désordres intestinaux liés à une alimentation pauvre en fibres. Grâce à sa technologie de micro-encapsulation brevetée, il permet la libération du Butyrate de manière prolongée le long de l'intestin grêle et du côlon. Mais le butyrate a aussi fait l'objet de nombreuses études comme agent chemo-thérapeutique anti-cancéreux, pour le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin et des maladies liées aux troubles métaboliques, pour le traitement des infections à *Clostridium difficile*, pour le traitement de la haute perméabilité des vaisseaux sanguins, pour le traitement des β -hémoglobinopathies (la β -thalassémie et l'anémie falciforme, la mucoviscidose) et pour la perte de poids. La tendance actuelle est de rechercher des analogues du Butyrate comme nouveaux actifs brevetables possédant les mêmes propriétés que le Butyrate pour permettre la valorisation et le financement de futures essais cliniques. De notre côté une étude de brevetabilité pour un Brevet d'application de l'utilisation du Butyrate pour le traitement de l'HTAP est en cours.

L'étude RNAseq a mis en évidence des cibles du butyrate, c'est-à-dire des gènes qui sont régulés par le butyrate dans le modèle MCT ainsi que les voies de signalisation et fonctions associées. Etudier l'expression génique et protéique ainsi que la fonction précise de ces gènes *in vitro* dans les CML et CE d'artères pulmonaires et *in vivo* dans les différents modèles d'HTP permettrait d'affiner le mécanisme d'action du Butyrate dans le cadre d'un future traitement de l'HTAP. Nous avons dû prendre la décision de cette approche de métabolite candidat car la stratégie que nous avons élaborée pour identifier des genres et espèces bactériennes (et leurs métabolites) spécifiquement nichés dans le parenchyme pulmonaire des patients HTAP comparé à celui de patients contrôle non-HTAP a souffert de différentes difficultés : 1) un retard considérable pris pendant la période Covid, pendant laquelle les plateformes de séquençages

étaient indisponibles et 2) la difficulté à mettre au point un protocole permettant d'analyser le microbiote du parenchyme pulmonaire le plus proche des artérioles remodelées de patients HTAP et 3) une fois l'étude menée, une hétérogénéité individuelle importante dans le peu de matériel bactérien présent, rendant l'étude différentielle difficile. Ce résultat est à mettre en perspective avec le fait que, s'agissant de l'étude du microbiote pulmonaire dans l'HTAP, la plupart des études utilisent des écouvillons pharyngés plutôt représentatifs des voies aériennes supérieures. Le LBA représentatif du microbiote des voies aériennes inférieures et des alvéoles est une approche contre indiquée chez les patients HTAP. Une publication est en préparation concernant ce travail sur le microbiote pulmonaire des patients HTAP.

Devant ce constat sur la difficulté d'étudier le microbiote du parenchyme pulmonaire chez les patients HTAP, nous avons conduit une étude dans le modèle MCT chez le rat comparant le microbiote pulmonaire de 2 compartiments pulmonaires (LBA et parenchyme) et celui de l'intestin. Nous avons montré que Firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteriota et Proteobacteria étaient les phyla les plus abondants dans l'intestin et dans le poumon. Les communautés bactériennes du parenchyme pulmonaire étaient différentes de celles du LBA et de l'intestin. Dans le microbiote intestinal, le groupe MCT était fortement corrélé à trois familles bactériennes : *Monoglobaceae*, *Oscillospiraceae* et *Clostridiaceae* alors que dans le microbiote du LBA, les rats MCT étaient corrélés positivement aux *Bifidobacteriaceae*. Quant au microbiote du parenchyme pulmonaire, les rats MCT étaient corrélés positivement avec les *Corynebacteriaceae*. Nous n'avons pas pu aller jusqu'à l'identification des genres et des espèces bactériennes et donc nous n'avons pas pu réaliser une étude de métagénomique fonctionnelle permettant de définir les métabolites en jeu. Mais nous avons noté que les *Oscillospiraceae* et les *Lachnospiraceae* sont connues pour être des bactéries productrices de butyrate et *Clostridiaceae* est identifiée comme une bactérie productrice de TMA/TMAO qui est un métabolite impliqué dans les risques cardiovasculaires. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de ces bactéries sur le développement de l'HTP dans des modèles de rats axéniques et de chercher à travers des techniques de séquençage ciblées ou par hybridation in situ sur coupe si ces bactéries sont présentes chez les patients HTAP.

Pour conclure, il n'a pas été possible d'aller jusqu'au bout des expériences qui m'auraient permis la pleine intégration des différentes parties de ces travaux. L'ensemble de nos données sont en faveur 1) d'un rôle de certaines niches bactériennes pulmonaires et de leurs métabolites, particulièrement le butyrate dans le remodelage vasculaire conduisant à l'HTAP, et 2) de l'idée selon laquelle l'absence de microbiote induit des changements structuraux pulmonaires tels que

le remodelage des petites artères pulmonaires avec de potentielles conséquences fonctionnelles pouvant former le lit de maladies respiratoires telles que l'HTAP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Humbert, M. *et al.* 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* **43**, 3618–3731 (2022).
2. Montani, D. *et al.* Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J* **47**, 1518–1534 (2016).
3. Kim, N. H. *et al.* Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **53**, 1801915 (2019).
4. Mullin, C. J. & Klinger, J. R. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Heart Fail Clin* **14**, 339–351 (2018).
5. Montani, D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* **8**, 97 (2013).
6. Ghigna, M.-R. & Dorfmueller, P. Pulmonary vascular disease and pulmonary hypertension. *Diagnostic Histopathology* **25**, 304–312 (2019).
7. Abe, K. *et al.* Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **121**, 2747–2754 (2010).
8. Pietra, G. G. *et al.* Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **43**, S25–S32 (2004).
9. Cool, C. D. *et al.* Three-Dimensional Reconstruction of Pulmonary Arteries in Plexiform Pulmonary Hypertension Using Cell-Specific Markers: Evidence for a Dynamic and Heterogeneous Process of Pulmonary Endothelial Cell Growth. *The American Journal of Pathology* **155**, 411–419 (1999).
10. Budhiraja, R., Tuder, R. M. & Hassoun, P. M. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Circulation* **109**, 159–165 (2004).
11. Evans, C. E., Cober, N. D., Dai, Z., Stewart, D. J. & Zhao, Y.-Y. Endothelial Cells in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Eur Respir J* **58**, 2003957 (2021).
12. Loscalzo, J. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **327**, 117–119 (1992).

13. Huertas, A. *et al.* Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay. *Circulation* **129**, 1332–1340 (2014).
14. Tu, L. *et al.* Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**, 311–322 (2011).
15. Sakao, S., Tatsumi, K. & Voelkel, N. F. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respir Res* **10**, 95 (2009).
16. Tuder, R. M., Groves, B., Badesch, D. B. & Voelkel, N. F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* **144**, 275–285 (1994).
17. Masri, F. A. *et al.* Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L548-554 (2007).
18. Lee, S. D. *et al.* Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **101**, 927–934 (1998).
19. Tuder, R. M. *et al.* Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol* **195**, 367–374 (2001).
20. Sakao, S., Taraseviciene-Stewart, L., Wood, K., Cool, C. D. & Voelkel, N. F. Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L362-368 (2006).
21. Li, D. *et al.* VEGF regulates FGF-2 and TGF- β 1 expression in injury endothelial cells and mediates smooth muscle cells proliferation and migration. *Microvascular Research* **77**, 134–142 (2009).

22. Giaid, A. *et al.* Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* **341**, 1550–1554 (1993).
23. Oliveira, S. D. S. *et al.* Injury-Induced Shedding of Extracellular Vesicles Depletes Endothelial Cells of Cav-1 (Caveolin-1) and Enables TGF- β (Transforming Growth Factor- β)-Dependent Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 1191–1202 (2019).
24. Kessler, P., Popp, R., Busse, R. & Schini-Kerth, V. B. Proinflammatory mediators chronically downregulate the formation of the endothelium-derived hyperpolarizing factor in arteries via a nitric oxide/cyclic GMP-dependent mechanism. *Circulation* **99**, 1878–1884 (1999).
25. Le Hiress, M. *et al.* Proinflammatory Signature of the Dysfunctional Endothelium in Pulmonary Hypertension. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor/CD74 Complex. *Am J Respir Crit Care Med* **192**, 983–997 (2015).
26. Rohlenova, K., Veys, K., Miranda-Santos, I., De Bock, K. & Carmeliet, P. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Trends Cell Biol* **28**, 224–236 (2018).
27. Budhiraja, R., Tuder, R. M. & Hassoun, P. M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* **109**, 159–165 (2004).
28. Eelen, G. *et al.* Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev* **98**, 3–58 (2018).
29. Bertero, T. *et al.* Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **126**, 3313–3335 (2016).
30. Sánchez-Duffhues, G., García de Vinuesa, A. & Ten Dijke, P. Endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases: Developmental signaling pathways gone awry. *Dev Dyn* **247**, 492–508 (2018).
31. Medici, D. & Kalluri, R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* **22**, 379–384 (2012).

32. Ranchoux, B. *et al.* Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension.
33. Good, R. B. *et al.* Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *The American Journal of Pathology* **185**, 1850–1858 (2015).
34. Tu, L. *et al.* A critical role for p130Cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 666–676 (2012).
35. Perros, F. *et al.* Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 81–88 (2008).
36. Xiao, Y. *et al.* PDGF Promotes the Warburg Effect in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α Signaling Pathway. *CPB* **42**, 1603–1613 (2017).
37. Deng, L. *et al.* PDGF/MEK/ERK axis represses Ca²⁺ clearance via decreasing the abundance of plasma membrane Ca²⁺ pump PMCA4 in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **320**, C66–C79 (2021).
38. Chen, J. *et al.* MiR-339 inhibits proliferation of pulmonary artery smooth muscle cell by targeting FGF signaling. *Physiol Rep* **5**, e13441 (2017).
39. Machado, R. D. *et al.* Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S32–S42 (2009).
40. Tielemans, B., Delcroix, M., Belge, C. & Quarcq, R. TGF β and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discovery Today* **24**, 703–716 (2019).
41. Jones, P. L., Cowan, K. N. & Rabinovitch, M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol* **150**, 1349–1360 (1997).

42. El Kasmi, K. C. *et al.* Adventitial fibroblasts induce a distinct proinflammatory/profibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension. *J Immunol* **193**, 597–609 (2014).
43. Wang, D. *et al.* MicroRNA-124 controls the proliferative, migratory, and inflammatory phenotype of pulmonary vascular fibroblasts. *Circ Res* **114**, 67–78 (2014).
44. Perros, F. *et al.* Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **185**, 311–321 (2012).
45. Li, C. *et al.* Immune cells and autoantibodies in pulmonary arterial hypertension. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **49**, 1047–1057 (2017).
46. Kherbeck, N. *et al.* The Role of Inflammation and Autoimmunity in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinic Rev Allerg Immunol* **44**, 31–38 (2013).
47. Breitling, S. *et al.* The mast cell-B cell axis in lung vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **312**, L710–L721 (2017).
48. Koudstaal, T. *et al.* DNGR1-Cre-mediated Deletion of Tnfrsf25/A20 in Conventional Dendritic Cells Induces Pulmonary Hypertension in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **63**, 665–680 (2020).
49. Cohen-Kaminsky, S., Hautefort, A., Price, L., Humbert, M. & Perros, F. Inflammation in pulmonary hypertension: what we know and what we could logically and safely target first. *Drug Discovery Today* **19**, 1251–1256 (2014).
50. Tamosiuniene, R. *et al.* Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circ Res* **109**, 867–879 (2011).
51. Tamby, M. C. Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* **28**, 799–807 (2006).

52. Steiner, M. K. *et al.* Interleukin-6 Overexpression Induces Pulmonary Hypertension. *Circulation Research* **104**, 236–244 (2009).
53. Korn, T. & Muschaweckh, A. Stability and Maintenance of Foxp3+ Treg Cells in Non-lymphoid Microenvironments. *Front Immunol* **10**, 2634 (2019).
54. Nicolls, M. R., Taraseviciene-Stewart, L., Rai, P. R., Badesch, D. B. & Voelkel, N. F. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J* **26**, 1110–1118 (2005).
55. Deng, Z. *et al.* Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* **67**, 737–744 (2000).
56. International PPH Consortium *et al.* Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* **26**, 81–84 (2000).
57. Atkinson, C. *et al.* Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* **105**, 1672–1678 (2002).
58. Machado, R. D. *et al.* BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet* **68**, 92–102 (2001).
59. Machado, R. D. *et al.* Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Hum Mutat* **36**, 1113–1127 (2015).
60. Andruska, A. & Spiekerkoetter, E. Consequences of BMPR2 Deficiency in the Pulmonary Vasculature and Beyond: Contributions to Pulmonary Arterial Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 2499 (2018).
61. Stacher, E. *et al.* Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 261–272 (2012).

62. Upton, P. D., Davies, R. J., Trembath, R. C. & Morrell, N. W. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* **284**, 15794–15804 (2009).
63. Morrell, N. W. Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling? *Proc Am Thorac Soc* **3**, 680–686 (2006).
64. Hopper, R. K. *et al.* In Pulmonary Arterial Hypertension, Reduced BMPR2 Promotes Endothelial-to-Mesenchymal Transition via HMGA1 and Its Target Slug. *Circulation* **133**, 1783–1794 (2016).
65. Zhang, S. *et al.* Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L740–754 (2003).
66. Dorai, H., Vukicevic, S. & Sampath, T. K. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol* **184**, 37–45 (2000).
67. Stenmark, K. R. *et al.* The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Compr Physiol* **1**, 141–161 (2011).
68. Ma, L. *et al.* A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **369**, 351–361 (2013).
69. Austin, E. D. *et al.* Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet* **5**, 336–343 (2012).
70. Zhu, N. *et al.* Rare variants in SOX17 are associated with pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Genome Med* **10**, 56 (2018).

71. Zhu, N. *et al.* Exome Sequencing in Children With Pulmonary Arterial Hypertension Demonstrates Differences Compared With Adults. *Circ Genom Precis Med* **11**, e001887 (2018).
72. Gräf, S. *et al.* Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun* **9**, 1416 (2018).
73. Francois, M., Koopman, P. & Beltrame, M. SoxF genes: Key players in the development of the cardio-vascular system. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 445–448 (2010).
74. Matsui, T. *et al.* Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *J Cell Sci* **119**, 3513–3526 (2006).
75. Corada, M. *et al.* Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nat Commun* **4**, 2609 (2013).
76. Lange, A. W. *et al.* Sox17 is required for normal pulmonary vascular morphogenesis. *Dev Biol* **387**, 109–120 (2014).
77. Thoré, P. *et al.* Phenotype and outcome of pulmonary arterial hypertension patients carrying a TBX4 mutation. *European Respiratory Journal* **55**, (2020).
78. Kerstjens-Frederikse, W. S. *et al.* TBX4 mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* **50**, 500–506 (2013).
79. Eyries, M. *et al.* Familial pulmonary arterial hypertension by KDR heterozygous loss of function. *European Respiratory Journal* **55**, (2020).
80. Best, D. H. *et al.* EIF2AK4 mutations in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Chest* **145**, 231–236 (2014).
81. Eyries, M. *et al.* EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet* **46**, 65–69 (2014).

82. Hassoun, P. M. Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **385**, 2361–2376 (2021).
83. Perros, F. *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 81–88 (2008).
84. Yamboliev, I. A. & Gerthoffer, W. T. Modulatory role of ERK MAPK-caldesmon pathway in PDGF-stimulated migration of cultured pulmonary artery SMCs. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1680-1688 (2001).
85. Centrella, M., McCarthy, T. L., Kusmik, W. F. & Canalis, E. Isoform-specific regulation of platelet-derived growth factor activity and binding in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *J Clin Invest* **89**, 1076–1084 (1992).
86. Gray, K. *et al.* Coordinate regulation by diethylstilbestrol of the platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) and -B chains and the PDGF receptor alpha- and beta-subunits in the mouse uterus and vagina: potential mediators of estrogen action. *Endocrinology* **136**, 2325–2340 (1995).
87. Terracio, L. *et al.* Induction of platelet-derived growth factor receptor expression in smooth muscle cells and fibroblasts upon tissue culturing. *Journal of Cell Biology* **107**, 1947–1957 (1988).
88. Heldin, C. H., Ostman, A. & Rönstrand, L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* **1378**, F79-113 (1998).
89. Noskovičová, N., Petřek, M., Eickelberg, O. & Heinzelmann, K. Platelet-derived growth factor signaling in the lung. From lung development and disease to clinical studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* **52**, 263–284 (2015).
90. Pietras, K., Sjöblom, T., Rubin, K., Heldin, C.-H. & Östman, A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* **3**, 439–443 (2003).

91. Heldin, C.-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal* **11**, 1–18 (2013).
92. Selimovic, N. *et al.* Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* **34**, 662–668 (2009).
93. Schermuly, R. T. *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* **115**, 2811–2821 (2005).
94. Jankov, R. P. *et al.* A role for platelet-derived growth factor beta-receptor in a newborn rat model of endothelin-mediated pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L1162-1170 (2005).
95. Ghofrani, H. A., Seeger, W. & Grimminger, F. Imatinib for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. [https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMc051946](https://doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMc051946) (2005) doi:10.1056/NEJMc051946.
96. Hoeper, M. M. *et al.* Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* **127**, 1128–1138 (2013).
97. Galkin, A. *et al.* Inhaled servalutinib exhibits potent efficacy in models of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **60**, 2102356 (2022).
98. Koch, S. & Claesson-Welsh, L. Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006502 (2012).
99. Eddahibi, S. *et al.* Imbalance between Platelet Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-derived Growth Factor in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 1493–1499 (2000).
100. Tuder, R. M. *et al.* Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *The Journal of Pathology* **195**, 367–374 (2001).

101. Hirose, S., Hosoda, Y., Furuya, S., Otsuki, T. & Ikeda, E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathology International* **50**, 472–479 (2000).
102. Burke, D. L. *et al.* Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **297**, L238–L250 (2009).
103. Cho, Y. J. *et al.* Temporal changes of angiopoietins and Tie2 expression in rat lungs after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Comp Med* **59**, 350–356 (2009).
104. Itokawa, T. *et al.* Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol Cancer Ther* **1**, 295–302 (2002).
105. Fong, T. A. *et al.* SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* **59**, 99–106 (1999).
106. Kasahara, Y. *et al.* Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* **106**, 1311–1319 (2000).
107. Voelkel, N. F. & Gomez-Arroyo, J. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Pulmonary Arterial Hypertension. The Angiogenesis Paradox. *Am J Respir Cell Mol Biol* **51**, 474–484 (2014).
108. Madri, J. A., Reidy, M. A., Kocher, O. & Bell, L. Endothelial cell behavior after denudation injury is modulated by transforming growth factor-beta1 and fibronectin. *Lab Invest* **60**, 755–765 (1989).
109. Akhurst, R. J., Lehnert, S. A., Faissner, A. & Duffie, E. TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* **108**, 645–656 (1990).

110. Millan, F. A., Denhez, F., Kondaiah, P. & Akhurst, R. J. Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* **111**, 131–143 (1991).
111. Massagué, J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 616–630 (2012).
112. ten Dijke, P. & Arthur, H. M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 857–869 (2007).
113. Curado, F. *et al.* ALK5 and ALK1 play antagonistic roles in transforming growth factor β -induced podosome formation in aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol* **34**, 4389–4403 (2014).
114. Blaney Davidson, E. N. *et al.* Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J Immunol* **182**, 7937–7945 (2009).
115. Garrido-Martín, E. M. *et al.* Vascular injury triggers Krüppel-like factor 6 mobilization and cooperation with specificity protein 1 to promote endothelial activation through upregulation of the activin receptor-like kinase 1 gene. *Circ Res* **112**, 113–127 (2013).
116. Yao, Y. *et al.* Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* **107**, 485–494 (2010).
117. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
118. Harper, R. L., Reynolds, A. M., Bonder, C. S. & Reynolds, P. N. BMPR2 gene therapy for PAH acts via Smad and non-Smad signalling. *Respirology* **21**, 727–733 (2016).
119. Pang, X. *et al.* Microbiota, Epithelium, Inflammation, and TGF- β Signaling: An Intricate Interaction in Oncogenesis. *Front Microbiol* **9**, 1353 (2018).

120. Verrecchia, F. & Mauviel, A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* **118**, 211–215 (2002).
121. Kubota, K., Okazaki, J., Louie, O., Kent, K. C. & Liu, B. TGF-beta stimulates collagen (I) in vascular smooth muscle cells via a short element in the proximal collagen promoter. *J Surg Res* **109**, 43–50 (2003).
122. Khan, R., Agrotis, A. & Bobik, A. Understanding the role of transforming growth factor-beta1 in intimal thickening after vascular injury. *Cardiovasc Res* **74**, 223–234 (2007).
123. Majack, R. A. Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures. *J Cell Biol* **105**, 465–471 (1987).
124. Reddy, K. B. & Howe, P. H. Transforming growth factor beta 1-mediated inhibition of smooth muscle cell proliferation is associated with a late G1 cell cycle arrest. *J Cell Physiol* **156**, 48–55 (1993).
125. Tielemans, B., Delcroix, M., Belge, C. & Quarcq, R. TGFβ and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discovery Today* **24**, 703–716 (2019).
126. Upton, P. D. & Morrell, N. W. The transforming growth factor-β–bone morphogenetic protein type signalling pathway in pulmonary vascular homeostasis and disease. *Experimental Physiology* **98**, 1262–1266 (2013).
127. Filip, M. & Bader, M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports* **61**, 761–777 (2009).
128. MacLean, M. R. *et al.* Serotonin and Pulmonary Hypertension; Sex and Drugs and ROCK and Rho. in *Comprehensive Physiology* 4103–4118 (John Wiley & Sons, Ltd, 2022). doi:10.1002/cphy.c220004.

129. Morecroft, I., Heeley, R. P., Prentice, H. M., Kirk, A. & MacLean, M. R. 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *British Journal of Pharmacology* **128**, 730–734 (1999).
130. Eddahibi, S. *et al.* Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* **113**, 1857–1864 (2006).
131. Guignabert, C. *et al.* Serotonin Transporter Inhibition Prevents and Reverses Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Circulation* **111**, 2812–2819 (2005).
132. Launay, J.-M. *et al.* Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* **8**, 1129–1135 (2002).
133. MacLean, M. R. Pulmonary hypertension, anorexigens and 5-HT: pharmacological synergism in action? *Trends in Pharmacological Sciences* **20**, 490–495 (1999).
134. Guilluy, C. *et al.* RhoA and Rho Kinase Activation in Human Pulmonary Hypertension: Role of 5-HT Signaling. *Am J Respir Crit Care Med* **179**, 1151–1158 (2009).
135. The 5-HT transporter transactivates the PDGF β receptor in pulmonary artery smooth muscle cells. doi:10.1096/fj.06-8058com.
136. Dempsie, Y. & MacLean, M. R. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *British Journal of Pharmacology* **155**, 455–462 (2008).
137. Lazarus, H. M. *et al.* A trial design to maximize knowledge of the effects of rodatristat ethyl in the treatment of pulmonary arterial hypertension (ELEVATE 2). *Pulm Circ* **12**, e12088 (2022).

138. Li, G. *et al.* The expression of survivin in irreversible pulmonary arterial hypertension rats and its value in evaluating the reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease. *Pulm Circ* **9**, 2045894019859480 (2019).
139. McMurtry, M. S. *et al.* Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* **115**, 1479–1491 (2005).
140. Blanc-Brude, O. P. *et al.* Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nat Med* **8**, 987–994 (2002).
141. Baccini, V. *et al.* Role of p21Cip1/Waf1 in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood* **98**, 3274–3282 (2001).
142. Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Verma, I. M. & Green, D. R. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol* **8**, 107–111 (1998).
143. Quatredeni, M. *et al.* Functional interaction between PDGF β and GluN2B-containing NMDA receptors in smooth muscle cell proliferation and migration in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **316**, L445–L455 (2019).
144. Liu, Y. *et al.* NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **27**, 2846–2857 (2007).
145. Dumas, S. J. *et al.* NMDA-Type Glutamate Receptor Activation Promotes Vascular Remodeling and Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **137**, 2371–2389 (2018).
146. Cowan, W. M. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci* **24**, 551–600 (2001).
147. Freund-Michel, V. & Frossard, N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics* **117**, 52–76 (2008).

148. Micera, A. *et al.* Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 6162–6167 (2001).
149. Freund-Michel, V. *et al.* Role of Nerve Growth Factor in Development and Persistence of Experimental Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **192**, 342–355 (2015).
150. Bouchet, C. *et al.* Inflammation and Oxidative Stress Induce NGF Secretion by Pulmonary Arterial Cells through a TGF- β 1-Dependent Mechanism. *Cells* **11**, 2795 (2022).
151. Davenport, A. P. *et al.* Endothelin. *Pharmacol Rev* **68**, 357–418 (2016).
152. Dupuis, J. *et al.* Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 in pulmonary hypertension. *American Heart Journal* **135**, 614–620 (1998).
153. Rondelet, B. *et al.* Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **107**, 1329–1335 (2003).
154. Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F. & Yazaki, Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* **238**, 249–252 (1988).
155. Kohno, M. *et al.* Effect of the Endothelin Family of Peptides on Human Coronary Artery Smooth-Muscle Cell Migration. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **31**, S84 (1998).
156. Ishida, N., Tsujioka, K., Tomoi, M., Saida, K. & Mitsui, Y. Differential activities of two distinct endothelin family peptides on ileum and coronary artery. *FEBS Letters* **247**, 337–340 (1989).
157. Naito, S. *et al.* *Ets* -1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **274**, C472–C480 (1998).

158. Rodriguez-Vita, J. *et al.* Endothelin-1, via ET_A Receptor and Independently of Transforming Growth Factor- β , Increases the Connective Tissue Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* **97**, 125–134 (2005).
159. Castaños, C. *et al.* Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J Cell Sci* **120**, 1256–1266 (2007).
160. Hosoda, K. *et al.* Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* **287**, 23–26 (1991).
161. MacLean, M. R., McCulloch, K. M. & Baird, M. Endothelin ETA- and ETB-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol* **23**, 838–845 (1994).
162. Ogawa, Y. *et al.* Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **178**, 248–255 (1991).
163. Davenport, A. P. *et al.* Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridization, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ETB receptors in human vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* **22 Suppl 8**, S22-25 (1993).
164. Capra, V. *et al.* Full and partial agonists of thromboxane prostanoid receptor unveil fine tuning of receptor superactive conformation and G protein activation. *PLoS One* **8**, e60475 (2013).
165. Ekambaram, P., Lambiv, W., Cazzolli, R., Ashton, A. W. & Honn, K. V. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **30**, 397–408 (2011).

166. Cogolludo, A., Moreno, L., Bosca, L., Tamargo, J. & Perez-Vizcaino, F. Thromboxane A₂-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C ζ . *Circ Res* **93**, 656–663 (2003).
167. Christman, B. W. *et al.* An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJM199207093270202> <https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJM199207093270202> (2010) doi:10.1056/NEJM199207093270202.
168. Bui, K. C. *et al.* Plasma prostanoids in neonatal extracorporeal membrane oxygenation. Influence of meconium aspiration. *J Thorac Cardiovasc Surg* **101**, 612–617 (1991).
169. Mulvaney, E. P. *et al.* The thromboxane receptor antagonist NTP42 promotes beneficial adaptation and preserves cardiac function in experimental models of right heart overload. *Front Cardiovasc Med* **9**, 1063967 (2022).
170. Mulvaney, E. P. *et al.* Efficacy of the thromboxane receptor antagonist NTP42 alone, or in combination with sildenafil, in the sugen/hypoxia-induced model of pulmonary arterial hypertension. *Eur J Pharmacol* **889**, 173658 (2020).
171. Mulvaney, E. P. *et al.* NTP42, a novel antagonist of the thromboxane receptor, attenuates experimentally induced pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med* **20**, 85 (2020).
172. Essais cliniques sur NTP42 : KVA4 - Registre des essais cliniques - ICH GCP. <https://ichgcp.net/fr/clinical-trials-registry/NCT04919863>.
173. Sheppard, M., Laskou, F., Stapleton, P. P., Hadavi, S. & Dasgupta, B. Tocilizumab (Actemra). *Hum Vaccin Immunother* **13**, 1972–1988 (2017).

174. Galiè, N., Manes, A. & Branzi, A. Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Med* **2**, 123–137 (2003).
175. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
176. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109–142 (1991).
177. Ignarro, L. J. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* **16**, 477–483 (1990).
178. Lázár, Z., Mészáros, M. & Bikov, A. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension: Pathomechanism, Biomarkers and Drug Targets. *Current Medicinal Chemistry* **27**, 7168–7188.
179. Giaid, A. & Saleh, D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **333**, 214–221 (1995).
180. Mason, N. A. *et al.* High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The Journal of Pathology* **185**, 313–318 (1998).
181. Zhao, Y.-Y. *et al.* Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. *J Clin Invest* **119**, 2009–2018 (2009).
182. Erewele, E. O. *et al.* Hypoxia-induced pulmonary hypertension upregulates eNOS and TGF- β contributing to sex-linked differences in BMPR2 +/R899X mutant mice. *Pulm Circ* **12**, e12163 (2022).
183. Murata, T., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H. & Karaki, H. Decreased Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Activity Resulting from Abnormal Interaction between eNOS and Its Regulatory Proteins in Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 44085–44092 (2002).

184. Campbell, A. I., Kuliszewski, M. A. & Stewart, D. J. Cell-based gene transfer to the pulmonary vasculature: Endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**, 567–575 (1999).
185. Kouyoumdjian, C. *et al.* Continuous inhalation of nitric oxide protects against development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *J Clin Invest* **94**, 578–584 (1994).
186. Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J. & Archer, S. L. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* **360**, j5492 (2018).
187. Perros, F. *et al.* Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **29**, 937–943 (2007).
188. Wang, R.-R. *et al.* Immunity and inflammation in pulmonary arterial hypertension: From pathophysiology mechanisms to treatment perspective. *Pharmacol Res* **180**, 106238 (2022).
189. Humbert, M. *et al.* Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 1628–1631 (1995).
190. Soon, E. *et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **122**, 920–927 (2010).
191. Sanchez, O. *et al.* Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 1041–1047 (2007).
192. Ranchoux, B. *et al.* Gut-Lung Connection in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **56**, 402–405 (2017).
193. Goldenberg, N. M. *et al.* Therapeutic Targeting of High-Mobility Group Box-1 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **199**, 1566–1569 (2019).

194. Liu, J. *et al.* IL-33 Initiates Vascular Remodelling in Hypoxic Pulmonary Hypertension by up-Regulating HIF-1 α and VEGF Expression in Vascular Endothelial Cells. *EBioMedicine* **33**, 196–210 (2018).
195. Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R. & Grimminger, F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* **8**, 443–455 (2011).
196. Kiely, D. G., Lawrie, A. & Humbert, M. Screening strategies for pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J Suppl* **21**, K9–K20 (2019).
197. Yanagisawa, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411–415 (1988).
198. Clozel, M. *et al.* Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 228–235 (1994).
199. Motte, S., McEntee, K. & Naeije, R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacology & Therapeutics* **110**, 386–414 (2006).
200. Billman, G. E. Ambrisentan (Myogen). *Curr Opin Investig Drugs* **3**, 1483–1486 (2002).
201. Galié, N. *et al.* Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **46**, 529–535 (2005).
202. Wu, C. *et al.* Discovery of TBC11251, a potent, long acting, orally active endothelin receptor-A selective antagonist. *J Med Chem* **40**, 1690–1697 (1997).
203. Barst, R. J. *et al.* Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **169**, 441–447 (2004).
204. Kuntz, M., Leiva-Juarez, M. M. & Luthra, S. Systematic Review of Randomized Controlled Trials of Endothelin Receptor Antagonists for Pulmonary Arterial Hypertension. *Lung* **194**, 723–732 (2016).

205. Pulido, T. *et al.* Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **369**, 809–818 (2013).
206. Fouassier, L. *et al.* Contribution of mrp2 in alterations of canalicular bile formation by the endothelin antagonist bosentan. *Journal of Hepatology* **37**, 184–191 (2002).
207. Archer, S. L. & Michelakis, E. D. Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **361**, 1864–1871 (2009).
208. Rosenzweig, E. B. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **11**, 127–132 (2010).
209. Galiè, N. *et al.* Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **353**, 2148–2157 (2005).
210. Parikh, V., Bhardwaj, A. & Nair, A. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension. *J Thorac Dis* **11**, S1767–S1781 (2019).
211. Simonneau, G. *et al.* Long-term sildenafil added to intravenous epoprostenol in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant* **33**, 689–697 (2014).
212. Boerrigter, G. *et al.* Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension* **49**, 1128–1133 (2007).
213. Ghofrani, H.-A. *et al.* Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **369**, 330–340 (2013).
214. Tuder, R. M. *et al.* Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 1925–1932 (1999).
215. Barst, R. J. *et al.* A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **334**, 296–301 (1996).

216. Gessler, T., Seeger, W. & Schmehl, T. The potential for inhaled treprostinil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Ther Adv Respir Dis* **5**, 195–206 (2011).
217. LeVarge, B. L. & Channick, R. N. Inhaled treprostinil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Review of Respiratory Medicine* **6**, 255–265 (2012).
218. Badesch, D. B. *et al.* Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **43**, S56–S61 (2004).
219. John, J. & Palevsky, H. Clinical pharmacology and efficacy of inhaled iloprost for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **4**, 197–205 (2011).
220. Skoro-Sajer, N. & Lang, I. M. Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **15**, 429–436 (2014).
221. Kuwano, K., Hashino, A., Noda, K., Kosugi, K. & Kuwabara, K. A long-acting and highly selective prostacyclin receptor agonist prodrug, 2-{4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}-N-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304), ameliorates rat pulmonary hypertension with unique relaxant responses of its active form, {4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}acetic acid (MRE-269), on rat pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 691–699 (2008).
222. Noel, Z. R., Kido, K. & Macaulay, T. E. Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Am J Health Syst Pharm* **74**, 1135–1141 (2017).
223. Demolis, J. L., Robert, A., Mouren, M., Funck-Brentano, C. & Jaillon, P. Pharmacokinetics and platelet antiaggregating effects of beraprost, an oral stable prostacyclin analogue, in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* **22**, 711–716 (1993).
224. Lindegaard Pedersen, M., Krüger, M., Grimm, D., Infanger, M. & Wehland, M. The prostacyclin analogue treprostinil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **126**, 32–42 (2020).

225. Hill, N. S., Cawley, M. J. & Heggen-Peay, C. L. New Therapeutic Paradigms and Guidelines in the Management of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Manag Care Spec Pharm* **22**, S3-21 (2016).
226. Sitbon, O. *et al.* Initial dual oral combination therapy in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* **47**, 1727–1736 (2016).
227. Fan, Z., Chen, Y. & Liu, H. Calcium channel blockers for pulmonary arterial hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* **2015**, CD010066 (2015).
228. McMurtry, I. F., Davidson, A. B., Reeves, J. T. & Grover, R. F. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res* **38**, 99–104 (1976).
229. Sitbon, O. *et al.* Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **111**, 3105–3111 (2005).
230. Humbert, M. *et al.* Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **384**, 1204–1215 (2021).
231. Hoeper, M. M. *et al.* Phase 3 Trial of Sotatercept for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* **388**, 1478–1490 (2023).
232. Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J. & Tang, X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1863**, 585–597 (2017).
233. Holmström, K. M. *et al.* Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biology Open* **2**, 761–770 (2013).
234. Oudiz, R. *et al.* Initial Data Report from “LARIAT”: A Phase 2 Study of Bardoxolone Methyl in PAH Patients on Stable Background Therapy. *CHEST* **148**, 639A (2015).
235. Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **22**, 358–363 (2003).

236. Savale, L. *et al.* Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res* **10**, 6 (2009).
237. Toshner, M. *et al.* Mendelian randomisation and experimental medicine approaches to interleukin-6 as a drug target in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **59**, 2002463 (2022).
238. Hsu, C.-H., Huang, W.-C. & Chang, W.-T. Future Perspectives of Pulmonary Hypertension Treatment. *Acta Cardiol Sin* **38**, 435–442 (2022).
239. Reid, M. J., Lamé, M. W., Morin, D., Wilson, D. W. & Segall, H. J. Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of 14C-monocrotaline in rat liver microsomes. *J Biochem Mol Toxicol* **12**, 157–166 (1998).
240. Wilson, D. W. *et al.* Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* **22**, 307–325 (1992).
241. Huang, J., Wolk, J. H., Gewitz, M. H. & Mathew, R. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. *Exp Lung Res* **36**, 57–66 (2010).
242. Ramos, M., Lamé, M. W., Segall, H. J. & Wilson, D. W. Monocrotaline pyrrole induces Smad nuclear accumulation and altered signaling expression in human pulmonary arterial endothelial cells. *Vascul Pharmacol* **46**, 439–448 (2007).
243. Tang, C. *et al.* Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **133**, 111081 (2021).
244. Carman, B. L., Predescu, D. N., Machado, R. & Predescu, S. A. Plexiform Arteriopathy in Rodent Models of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol* **189**, 1133–1144 (2019).

245. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. & McMurtry, I. F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L1013-1032 (2009).
246. Naeije, R. & Dewachter, L. [Animal models of pulmonary arterial hypertension]. *Rev Mal Respir* **24**, 481–496 (2007).
247. Bull, T. M., Coldren, C. D., Geraci, M. W. & Voelkel, N. F. Gene expression profiling in pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc* **4**, 117–120 (2007).
248. Hoshikawa, Y. *et al.* Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice. *Physiol Genomics* **12**, 209–219 (2003).
249. Taraseviciene-Stewart, L. *et al.* Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J* **15**, 427–438 (2001).
250. Bueno-Beti, C., Hadri, L., Hajjar, R. J. & Sassi, Y. The Sugren 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Arterial Hypertension. in *Experimental Models of Cardiovascular Diseases: Methods and Protocols* (ed. Ishikawa, K.) 243–252 (Springer, 2018).
doi:10.1007/978-1-4939-8597-5_19.
251. Al-Qazazi, R. *et al.* Macrophage–NLRP3 Activation Promotes Right Ventricle Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **206**, 608–624.
252. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. & McMurtry, I. F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L1013-1032 (2009).
253. Bousamra, M. *et al.* Systemic lobar shunting induces advanced pulmonary vasculopathy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **120**, 88–98 (2000).
254. Rondelet, B. *et al.* Bosentan for the Prevention of Overcirculation-Induced Experimental Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **107**, 1329–1335 (2003).

255. Cox, M. J., Cookson, W. O. C. M. & Moffatt, M. F. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics* **22**, R88–R94 (2013).
256. Berg, G. *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* **8**, 103 (2020).
257. Speers, A. M., Cologgi, D. L. & Reguera, G. Anaerobic Cell Culture. *Current Protocols in Microbiology* **12**, A.4F.1–A.4F.16 (2009).
258. Stricker, S., Hain, T., Chao, C.-M. & Rudloff, S. Respiratory and Intestinal Microbiota in Pediatric Lung Diseases—Current Evidence of the Gut–Lung Axis. *Int J Mol Sci* **23**, 6791 (2022).
259. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402 (1997).
260. Microbiome Informatics: OTU vs. ASV. *ZYMO RESEARCH*
<https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/microbiome-informatics-otu-vs-asv> (2020).
261. Callahan, B. J. *et al.* High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res* **47**, e103–e103 (2019).
262. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* **13**, 581–583 (2016).
263. Sun, D.-L., Jiang, X., Wu, Q. L. & Zhou, N.-Y. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Appl Environ Microbiol* **79**, 5962–5969 (2013).
264. Edgar, R. C. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* **34**, 2371–2375 (2018).
265. Schloss, P. D. Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *mSphere* **6**, e00191-21.

266. Chouly, F. Modélisation physique des voies aériennes supérieures pour le Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil. (Physical modelling of the upper airway for Obstructive Sleep Apnea Syndrome). in (2005).
267. Marsland, B. J., Yadava, K. & Nicod, L. P. The Airway Microbiome and Disease. *Chest* **144**, 632–637 (2013).
268. Guilloux, C.-A., Lamoureux, C. & Héry-Arnaud, G. Les bactéries anaérobies, ces inconnues du microbiote pulmonaire. *Med Sci (Paris)* **34**, 253–260 (2018).
269. Vong, O. Le microbiote pulmonaire, un enjeu récent en microbiologie médicale. *Société Française de Microbiologie* <https://www.sfm-microbiologie.org/2020/06/10/9870/> (2020).
270. Hilty, M. *et al.* Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* **5**, e8578 (2010).
271. Sze, M. A. *et al.* The Lung Tissue Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **185**, 1073–1080 (2012).
272. Kim, H. J. *et al.* The microbiome of the lung and its extracellular vesicles in nonsmokers, healthy smokers and COPD patients. *Exp Mol Med* **49**, e316 (2017).
273. Charlson, E. S. *et al.* Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 536–545 (2012).
274. Dickson, R. P. *et al.* Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. *mBio* **8**, e02287-16 (2017).
275. Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P. & Reid, G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods* **95**, 401–414 (2013).

276. Pichon, M., Lina, B. & Josset, L. Caractérisation et impact du microbiote bactérien respiratoire sur les maladies virales. *Virologie* **22**, 161–172 (2018).
277. Erb-Downward, J. R. *et al.* Analysis of the lung microbiome in the ‘healthy’ smoker and in COPD. *PLoS One* **6**, e16384 (2011).
278. Huse, S. M., Ye, Y., Zhou, Y. & Fodor, A. A. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One* **7**, e34242 (2012).
279. Chu, D. M. *et al.* Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* **23**, 314–326 (2017).
280. Dahyot, S., Lemee, L. & Pestel-Caron, M. [Description and role of bacteriological techniques in the management of lung infections]. *Rev Mal Respir* **34**, 1098–1113 (2017).
281. Biopsie pulmonaire - thoracoscopie. *Chirvtt* <https://www.chirvtt.fr/chirurgie-thorax/biopsie-pulmonaire-thoracoscopie/>.
282. Anderson, S. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. *Nucleic Acids Res* **9**, 3015–3027 (1981).
283. Woese, C. R. & Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088–5090 (1977).
284. Rhoads, A. & Au, K. F. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **13**, 278–289 (2015).
285. Gordon, S. P. *et al.* Widespread Polycistronic Transcripts in Fungi Revealed by Single-Molecule mRNA Sequencing. *PLoS One* **10**, e0132628 (2015).
286. AccuraScience | Blogues.
https://www2 accurascience.com/blogs_3_0.html?gclid=CjwKCAiA9NGfBhBvEiwAq5vSy5dP_NsbhqUWFDiu_b_waSWIHWcPjTTToC9OIogyGQqFK1RZzyWGVfRoCZNoQAvD_BwE.

287. Loman, N. J. *et al.* High-throughput bacterial genome sequencing: An embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 599–606 (2012).
288. Weissenbach, J. & Sghir, A. Microbiotes et métagénomique. *Med Sci (Paris)* **32**, 937–943 (2016).
289. Transcriptomique : définition et explications. *AquaPortail*
<https://www.aquaportail.com/definition-15279-transcriptomique.html>.
290. Huffnagle, G. B., Dickson, R. P. & Lukacs, N. W. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunology* **10**, 299–306 (2017).
291. Koch, C. D. *et al.* Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: Intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health. *Free Radical Biology and Medicine* **105**, 48–67 (2017).
292. Michon, A.-L. & Marchandin, H. Diversité physiopathologique du microbiote respiratoire. *Revue Francophone des Laboratoires* **2015**, 37–49 (2015).
293. Hilty, M. *et al.* Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* **5**, e8578 (2010).
294. Hasleton, P. S. The internal surface area of the adult human lung. *J Anat* **112**, 391–400 (1972).
295. Marsland, B. J. & Gollwitzer, E. S. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* **14**, 827–835 (2014).
296. O'Neill, K. *et al.* Reduced bacterial colony count of anaerobic bacteria is associated with a worsening in lung clearance index and inflammation in cystic fibrosis. *PLoS One* **10**, e0126980 (2015).
297. Kloepfer, K. M. *et al.* In Children, the Microbiota of the Nasopharynx and Bronchoalveolar Lavage Fluid are Both Similar and Different. *Pediatr Pulmonol* **53**, 475–482 (2018).

298. Dickson, R. P. *et al.* Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Annals ATS* **12**, 821–830 (2015).
299. Seong, C. N. *et al.* Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *J Microbiol.* **56**, 1–10 (2018).
300. *Microbiologie médicale.* (Branche médicale de l'Université du Texas à Galveston, 1996).
301. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
302. Desai, M. S. *et al.* A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **167**, 1339–1353.e21 (2016).
303. Kurilshikov, A., Wijnenga, C., Fu, J. & Zhernakova, A. Host Genetics and Gut Microbiome: Challenges and Perspectives. *Trends Immunol* **38**, 633–647 (2017).
304. Conlon, M. A. & Bird, A. R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* **7**, 17–44 (2014).
305. Binda, C. *et al.* Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis* **50**, 421–428 (2018).
306. Protéobactérie : définition et explications. *AquaPortail*
<https://www.aquaportail.com/definition-2482-proteobacterie.html>.
307. Bosch, A. A. T. M. *et al.* Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine* **9**, 336–345 (2016).
308. Dominguez-Bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11971–11975 (2010).

309. Aagaard, K. *et al.* The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med* **6**, 237ra65 (2014).
310. Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E. & Salminen, S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* **6**, 23129 (2016).
311. Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. *Cell Host & Microbe* **24**, 857-865.e4 (2018).
312. Bosch, A. A. T. M. *et al.* Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* **196**, 1582–1590 (2017).
313. Biesbroek, G. *et al.* Early Respiratory Microbiota Composition Determines Bacterial Succession Patterns and Respiratory Health in Children. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 1283–1292 (2014).
314. Cui, L. *et al.* Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **191**, 932–942 (2015).
315. Dickson, R. P., Martinez, F. J. & Huffnagle, G. B. The Role of the Microbiome in Exacerbations of Chronic Lung Diseases. *Lancet* **384**, 691–702 (2014).
316. Stark, P. L. & Lee, A. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. *J Hyg (Lond)* **89**, 59–67 (1982).
317. Dominguez-Bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11971–11975 (2010).
318. Cui, L. *et al.* Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **191**, 932–942 (2015).

319. Hoskin-Parr, L., Teyhan, A., Blocker, A. & Henderson, A. J. W. Antibiotic exposure in the first two years of life and development of asthma and other allergic diseases by 7.5 yr: a dose-dependent relationship. *Pediatr Allergy Immunol* **24**, 762–771 (2013).
320. Yun, Y. *et al.* Environmentally Determined Differences in the Murine Lung Microbiota and Their Relation to Alveolar Architecture. *PLoS One* **9**, e113466 (2014).
321. Kostric, M. *et al.* Development of a Stable Lung Microbiome in Healthy Neonatal Mice. *Microb Ecol* **75**, 529–542 (2018).
322. Saint-Criq, V., Lugo-Villarino, G. & Thomas, M. Dysbiosis, malnutrition and enhanced gut-lung axis contribute to age-related respiratory diseases. *Ageing Research Reviews* **66**, 101235 (2021).
323. He, Y. *et al.* Gut-lung axis: The microbial contributions and clinical implications. *Crit Rev Microbiol* **43**, 81–95 (2017).
324. Beck, J. M., Young, V. B. & Huffnagle, G. B. The microbiome of the lung. *Transl Res* **160**, 258–266 (2012).
325. Schuijt, T. J. *et al.* The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* **65**, 575–583 (2016).
326. Trompette, A. *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* **20**, 159–166 (2014).
327. van Nimwegen, F. A. *et al.* Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 948-955.e1–3 (2011).
328. Brown, R. L., Sequeira, R. P. & Clarke, T. B. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat Commun* **8**, 1512 (2017).
329. Liu, Q., Tian, X., Maruyama, D., Arjomandi, M. & Prakash, A. Lung immune tone via gut-lung axis: gut-derived LPS and short-chain fatty acids' immunometabolic regulation of

- lung IL-1 β , FFAR2, and FFAR3 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **321**, L65–L78 (2021).
330. Groves, H. T. *et al.* Respiratory Disease following Viral Lung Infection Alters the Murine Gut Microbiota. *Front Immunol* **9**, 182 (2018).
331. Gopalakrishnan, V., Helmink, B. A., Spencer, C. N., Reuben, A. & Wargo, J. A. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell* **33**, 570–580 (2018).
332. Sepich-Poore, G. D. *et al.* The microbiome and human cancer. *Science* **371**, eabc4552 (2021).
333. Zhang, W.-Q. *et al.* Alterations of fecal bacterial communities in patients with lung cancer. *Am J Transl Res* **10**, 3171–3185 (2018).
334. Derosa, L. *et al.* Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in advanced non-small cell lung cancer patients. *Nat Med* **28**, 315–324 (2022).
335. Huang, L., Zhang, H., Liu, Y. & Long, Y. The Role of Gut and Airway Microbiota in Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Microbiol* **13**, 929752 (2022).
336. RP165_hadchouel.pdf.
337. Littman, D. R. & Pamer, E. G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe* **10**, 311–323 (2011).
338. Deshmukh, H. S. *et al.* The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med* **20**, 524–530 (2014).
339. Brown, R. L., Sequeira, R. P. & Clarke, T. B. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat Commun* **8**, 1512 (2017).
340. Budden, K. F. *et al.* Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nat Rev Microbiol* **15**, 55–63 (2017).

341. Yildiz, S., Mazel-Sanchez, B., Kandasamy, M., Manicassamy, B. & Schmolke, M. Influenza A virus infection impacts systemic microbiota dynamics and causes quantitative enteric dysbiosis. *Microbiome* **6**, 9 (2018).
342. Richards, L. B. *et al.* Butyrate and Propionate Restore the Cytokine and House Dust Mite Compromised Barrier Function of Human Bronchial Airway Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* **22**, 65 (2020).
343. Bernasconi, E. *et al.* Airway microbiota determines innate cell inflammatory or tissue remodeling profiles in lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **194**, 1252–1263 (2016).
344. Nembrini, C. *et al.* Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax* **66**, 755–763 (2011).
345. Larsen, J. M. *et al.* Divergent Pro-Inflammatory Profile of Human Dendritic Cells in Response to Commensal and Pathogenic Bacteria Associated with the Airway Microbiota. *PLOS ONE* **7**, e31976 (2012).
346. Remot, A. *et al.* Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J* **11**, 1061–1074 (2017).
347. Olszak, T. *et al.* Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* **336**, 489–493 (2012).
348. Gollwitzer, E. S. *et al.* Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med* **20**, 642–647 (2014).
349. Mathieu, E. *et al.* Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. *Front Physiol* **9**, 1168 (2018).
350. Barry, K. C., Fontana, M. F., Portman, J. L., Dugan, A. S. & Vance, R. E. IL-1 α signaling initiates the inflammatory response to virulent *Legionella pneumophila* in vivo. *J Immunol* **190**, 6329–6339 (2013).

351. Dickson, R. P. *et al.* The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *Am J Respir Crit Care Med* **198**, 497–508 (2018).
352. Holt, P. G. & Jones, C. A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* **55**, 688–697 (2000).
353. Gollwitzer, E. S. *et al.* Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med* **20**, 642–647 (2014).
354. Lynch, S. V. *et al.* Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urban children. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 593-601.e12 (2014).
355. Guilloteau, P. *et al.* From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev* **23**, 366–384 (2010).
356. Huffnagle, G. B. Increase in dietary fiber dampens allergic responses in the lung. *Nat Med* **20**, 120–121 (2014).
357. Thorburn, A. N., Macia, L. & Mackay, C. R. Diet, metabolites, and ‘western-lifestyle’ inflammatory diseases. *Immunity* **40**, 833–842 (2014).
358. Poul, E. L. *et al.* Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 25481–25489 (2003).
359. Thangaraju, M. *et al.* GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res* **69**, 2826–2832 (2009).
360. Peters, S. G., Pomare, E. W. & Fisher, C. A. Portal and peripheral blood short chain fatty acid concentrations after caecal lactulose instillation at surgery. *Gut* **33**, 1249–1252 (1992).

361. Kimura, I. *et al.* Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8030–8035 (2011).
362. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **165**, 1332–1345 (2016).
363. Brown, A. J. *et al.* The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 11312–11319 (2003).
364. Briscoe, C. P. *et al.* The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR40 Is Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 11303–11311 (2003).
365. Louis, P. & Flint, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* **294**, 1–8 (2009).
366. Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A. & Kimura, I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients* **7**, 2839–2849 (2015).
367. Louis, P. *et al.* Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *J Bacteriol* **186**, 2099–2106 (2004).
368. Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. & Macfarlane, G. T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221–1227 (1987).
369. Fotheringham, S. *et al.* Genome-wide Loss-of-Function Screen Reveals an Important Role for the Proteasome in HDAC Inhibitor-Induced Apoptosis. *Cancer Cell* **15**, 57–66 (2009).

370. Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**, 2485S-2493S (2003).
371. Louis, P. & Flint, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* **19**, 29–41 (2017).
372. Donohoe, D. R. *et al.* The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol Cell* **48**, 612–626 (2012).
373. Yonezawa, T., Kobayashi, Y. & Obara, Y. Short-chain fatty acids induce acute phosphorylation of the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway via GPR43 in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cellular Signalling* **19**, 185–193 (2007).
374. Gao, Z. *et al.* Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* **58**, 1509–1517 (2009).
375. Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12017–12022 (2007).
376. Cantoni, S. *et al.* Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration in pulmonary artery smooth muscle cells through Akt inhibition. *The FEBS Journal* **280**, 2042–2055 (2013).
377. Wang, F. *et al.* Sodium butyrate inhibits migration and induces AMPK-mTOR pathway-dependent autophagy and ROS-mediated apoptosis via the miR-139-5p/Bmi-1 axis in human bladder cancer cells. *The FASEB Journal* **34**, 4266–4282 (2020).
378. Wang, D. *et al.* Two hour exposure to sodium butyrate sensitizes bladder cancer to anticancer drugs. *International Journal of Urology* **15**, 435–441 (2008).
379. Mirzaei, R. *et al.* Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **139**, 111619 (2021).

380. Xiao, X., Cao, Y. & Chen, H. Profiling and characterization of microRNAs responding to sodium butyrate treatment in A549 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **119**, 3563–3573 (2018).
381. Kim, K. *et al.* Propionate of a microbiota metabolite induces cell apoptosis and cell cycle arrest in lung cancer. *Molecular Medicine Reports* **20**, 1569–1574 (2019).
382. Karoor, V. *et al.* The Short-Chain Fatty Acid Butyrate Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling and Inflammation in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci* **22**, 9916 (2021).
383. Yang, W. *et al.* Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat Commun* **11**, 4457 (2020).
384. Ouyang, W. & O’Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* **50**, 871–891 (2019).
385. Chen, G. *et al.* Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. *EBioMedicine* **30**, 317–325 (2018).
386. Liu, T. *et al.* Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation* **35**, 1676–1684 (2012).
387. Gilfillan, A. M. & Tkaczyk, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* **6**, 218–230 (2006).
388. Budden, K. F. *et al.* Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *The Lancet Respiratory Medicine* **7**, 907–920 (2019).
389. Chotirmall, S. H. *et al.* Microbiomes in respiratory health and disease: An Asia-Pacific perspective. *Respirology* **22**, 240–250 (2017).

390. Dumas, A., Bernard, L., Poquet, Y., Lugo-Villarino, G. & Neyrolles, O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell Microbiol* **20**, e12966 (2018).
391. Huang, Y. J. *et al.* The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **136**, 874–884 (2015).
392. Huang, Y. J. *et al.* Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**, 372–381.e3 (2011).
393. Hilty, M. *et al.* Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* **5**, e8578 (2010).
394. Rosas-Salazar, C. *et al.* Nasopharyngeal *Lactobacillus* is associated with a reduced risk of childhood wheezing illnesses following acute respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Allergy Clin Immunol* **142**, 1447–1456.e9 (2018).
395. Biesbroek, G. *et al.* Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 1283–1292 (2014).
396. Durack, J. *et al.* Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **140**, 63–75 (2017).
397. Thorburn, A. N. *et al.* Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun* **6**, 7320 (2015).
398. Lamoureux, C., Guilloux, C.-A., Beauruelle, C., Jolivet-Gougeon, A. & Héry-Arnaud, G. Anaerobes in cystic fibrosis patients' airways. *Critical Reviews in Microbiology* **45**, 103–117 (2019).

399. Sibley, C. D., Rabin, H. & Surette, M. G. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future Microbiology* **1**, 53–61 (2006).
400. Laguna, T. A. *et al.* Airway Microbiota in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Clinically Well Infants with Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* **11**, e0167649 (2016).
401. Frayman, K. B. *et al.* Differences in the lower airway microbiota of infants with and without cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **18**, 646–652 (2019).
402. Carmody, L. A. *et al.* Fluctuations in airway bacterial communities associated with clinical states and disease stages in cystic fibrosis. *PLoS ONE* **13**, e0194060 (2018).
403. Muhlebach, M. S. *et al.* Anaerobic bacteria cultured from cystic fibrosis airways correlate to milder disease: a multisite study. *Eur Respir J* **52**, 1800242 (2018).
404. van der Gast, C. J. *et al.* Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *ISME J* **5**, 780–791 (2011).
405. Lange, P., Ahmed, E., Lahmar, Z. M., Martinez, F. J. & Bourdin, A. Natural history and mechanisms of COPD. *Respirology* **26**, 298–321 (2021).
406. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R. & Huffnagle, G. B. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Review of Respiratory Medicine* **7**, 245–257 (2013).
407. Albert, R. K. *et al.* Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med* **365**, 689–698 (2011).
408. Bozinovski, S. *et al.* COPD and squamous cell lung cancer: aberrant inflammation and immunity is the common link. *Br J Pharmacol* **173**, 635–648 (2016).
409. Park, H. Y. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer incidence in never smokers: a cohort study. *Thorax* **75**, 506–509 (2020).
410. Kim, S. *et al.* Altered Gut Microbiome Profile in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension* **75**, 1063–1071 (2020).

411. Tsay, J.-C. J. *et al.* Airway Microbiota Is Associated with Upregulation of the PI3K Pathway in Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* **198**, 1188–1198 (2018).
412. Zhang, C. *et al.* Altered Airway Microbiota Composition in Patients With Pulmonary Hypertension. *Hypertension* **76**, 1589–1599 (2020).
413. Kumar, R. *et al.* Interstitial macrophage-derived thrombospondin-1 contributes to hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* **116**, 2021–2030 (2020).
414. Mouraux, S. *et al.* Airway microbiota signals anabolic and catabolic remodeling in the transplanted lung. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 718-729.e7 (2018).
415. Segal, L. N. *et al.* Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol* **1**, 16031 (2016).
416. Jose, A. *et al.* A unique gut microbiota signature in pulmonary arterial hypertension: A pilot study. *Pulm Circ* **12**, e12051 (2022).
417. Wang, T. *et al.* Respiratory Microbiome Profile of Pediatric Pulmonary Hypertension Patients Associated With Congenital Heart Disease. *Hypertension* **80**, 214–226 (2023).
418. Callejo, M. *et al.* Pulmonary Arterial Hypertension Affects the Rat Gut Microbiome. *Sci Rep* **8**, 9681 (2018).
419. Sanada, T. J. *et al.* Gut microbiota modification suppresses the development of pulmonary arterial hypertension in an SU5416/hypoxia rat model. *Pulm Circ* **10**, 2045894020929147 (2020).
420. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12204–12209 (2010).
421. Kataoka, H. *et al.* *Rothia dentocariosa* induces TNF- α production in a TLR2-dependent manner. *Pathog Dis* **71**, 65–68 (2014).

422. Hong, W. *et al.* Changes in the gut microbiome and metabolome in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Bioengineered* **12**, 5173–5183 (2021).
423. Sharma, R. K. *et al.* Pulmonary arterial hypertension-associated changes in gut pathology and microbiota. *ERJ Open Res* **6**, 00253–02019 (2020).
424. Luo, L. *et al.* MSCs Therapy Reverse the Gut Microbiota in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension Mice. *Front Physiol* **12**, 712139 (2021).
425. Budden, K. F. *et al.* Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *The Lancet Respiratory Medicine* **7**, 907–920 (2019).
426. Chotirmall, S. H. *et al.* Microbiomes in respiratory health and disease: An Asia-Pacific perspective. *Respirology* **22**, 240–250 (2017).
427. Hathaway-Schrader, J. D. *et al.* Antibiotic Perturbation of Gut Microbiota Dysregulates Osteoimmune Cross Talk in Postpubertal Skeletal Development. *The American Journal of Pathology* **189**, 370 (2019).
428. Elvers, K. T. *et al.* Antibiotic-induced changes in the human gut microbiota for the most commonly prescribed antibiotics in primary care in the UK: a systematic review. *BMJ Open* **10**, e035677 (2020).
429. Anderson, J. L., Miles, C. & Tierney, A. C. Effect of probiotics on respiratory, gastrointestinal and nutritional outcomes in patients with cystic fibrosis: A systematic review. *Journal of Cystic Fibrosis* **16**, 186–197 (2017).
430. Chen, Y.-S., Lin, Y.-L., Jan, R.-L., Chen, H.-H. & Wang, J.-Y. Randomized placebo-controlled trial of lactobacillus on asthmatic children with allergic rhinitis. *Pediatric Pulmonology* **45**, 1111–1120 (2010).
431. Dowling, R. B. *et al.* Effect of salmeterol on *Pseudomonas aeruginosa* infection of respiratory mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 327–336 (1997).

432. Gutkowski, P. *et al.* Clinical immunology
 Effect of orally administered probiotic strains *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in children with atopic asthma. *Cent Eur J Immunol* **35**, (2011).
433. Malik, M. *et al.* Lactobacillus plantarum 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men With Stable Coronary Artery Disease. *Circ Res* **123**, 1091–1102 (2018).
434. Wedgwood, S. *et al.* The developing gut-lung axis: postnatal growth restriction, intestinal dysbiosis, and pulmonary hypertension in a rodent model. *Pediatr Res* **87**, 472–479 (2020).
435. Remot, A. *et al.* Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J* **11**, 1061–1074 (2017).
436. Debarry, J. *et al.* Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1514–1521 (2007).
437. Chen, D. *et al.* Clostridium butyricum, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota. *Cancer Letters* **469**, 456–467 (2020).
438. Feng, W. *et al.* Alginate Oligosaccharide Alleviates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension via Anti-Oxidant and Anti-Inflammation Pathways in Rats. *Int Heart J* **61**, 160–168 (2020).
439. Shannon, E., Conlon, M. & Hayes, M. Seaweed Components as Potential Modulators of the Gut Microbiota. *Mar Drugs* **19**, 358 (2021).
440. Zhong, Y. *et al.* Maternal omega-3 PUFA supplementation prevents hyperoxia-induced pulmonary hypertension in the offspring. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **315**, L116–L132 (2018).

441. Sztuka, K., Orszulak-Michalak, D. & Jasińska-Stroschein, M. Systematic review and meta-analysis of interventions tested in animal models of pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol* **110**, 55–63 (2018).
442. Essilfie, A.-T. *et al.* Combined Haemophilus influenzae respiratory infection and allergic airways disease drives chronic infection and features of neutrophilic asthma. *Thorax* **67**, 588–599 (2012).
443. Lee, S., Eick, A., Bloom, M. S. & Brundage, J. F. Influenza immunization and subsequent diagnoses of group A streptococcus-illnesses among U.S. Army trainees, 2002–2006. *Vaccine* **26**, 3383–3386 (2008).
444. Latham, R. D. *et al.* An isolate of Haemophilus haemolyticus produces a bacteriocin-like substance that inhibits the growth of nontypeable Haemophilus influenzae. *International Journal of Antimicrobial Agents* **49**, 503–506 (2017).
445. Budden, K. F. *et al.* Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir Med* **7**, 907–920 (2019).
446. Vicencio, A. G. *et al.* Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 650–656 (2004).
447. Botney, M. D., Bahadori, L. & Gold, L. I. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol* **144**, 286–295 (1994).
448. Vicencio, A. G., Eickelberg, O., Stankewich, M. C., Kashgarian, M. & Haddad, G. G. Regulation of TGF-beta ligand and receptor expression in neonatal rat lungs exposed to chronic hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **93**, 1123–1130 (2002).
449. Walsh-Sukys, M. C. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. The black box revisited. *Clin Perinatol* **20**, 127–143 (1993).

450. Goodman, G. *et al.* Pulmonary hypertension in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* **112**, 67–72 (1988).
451. Atarashi, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232–236 (2013).
452. Ihara, S., Hirata, Y. & Koike, K. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J Gastroenterol* **52**, 777–787 (2017).
453. Martin-Gallausiaux, C. *et al.* Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep* **8**, 9742 (2018).
454. Atarashi, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232–236 (2013).
455. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
456. Seki, H. *et al.* Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by Clostridium butyricum MIYAIRI. *Pediatr Int* **45**, 86–90 (2003).
457. Kashiwagi, I. *et al.* Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- β Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells. *Immunity* **43**, 65–79 (2015).
458. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
459. Bhattacharya, S. S. *et al.* Crosstalk between gut microbiota and lung inflammation in murine toxicity models of respiratory exposure or co-exposure to carbon nanotube particles and cigarette smoke extract. *Toxicology and Applied Pharmacology* **447**, 116066 (2022).
460. Chakraborty, M. & Kotecha, S. Pulmonary surfactant in newborn infants and children. *Breathe* **9**, 476–488 (2013).

461. Mariencheck, W. I., Alcorn, J. F., Palmer, S. M. & Wright, J. R. Pseudomonas aeruginosa Elastase Degrades Surfactant Proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 528–537 (2003).
462. Pral, Laís. P., Fachi, José. L., Corrêa, R. O., Colonna, M. & Vinolo, M. A. R. Hypoxia and HIF-1 as key regulators of gut microbiota and host interactions. *Trends Immunol* **42**, 604–621 (2021).
463. Holden, V. I., Breen, P., Houle, S., Dozois, C. M. & Bachman, M. A. Klebsiella pneumoniae Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia. *mBio* **7**, e01397-16 (2016).
464. Guan, R. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits cigarette smoke-induced inflammation and injury in alveolar epithelial cells by suppressing PHD2/HIF-1 α /MAPK signaling pathway. *Int Immunopharmacol* **81**, 105979 (2020).
465. van Dijk, A., Hedegaard, C. J., Haagsman, H. P. & Heegaard, P. M. H. The potential for immunoglobulins and host defense peptides (HDPs) to reduce the use of antibiotics in animal production. *Vet Res* **49**, 68 (2018).
466. Kiani, A. A. *et al.* Study on hypoxia-inducible factor and its roles in immune system. *Immunological Medicine* **44**, 223–236 (2021).
467. Eurlings, I. M. J. *et al.* Cigarette Smoke Extract Induces a Phenotypic Shift in Epithelial Cells; Involvement of HIF1 α in Mesenchymal Transition. *PLOS ONE* **9**, e107757 (2014).
468. Palazón, A. *et al.* The HIF-1 α hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy. *Cancer Discov* **2**, 608–623 (2012).
469. Palazon, A. *et al.* An HIF-1 α /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell* **32**, 669-683.e5 (2017).

470. Lee, K. E. *et al.* Hif1a Deletion Reveals Pro-Neoplastic Function of B Cells in Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discov* **6**, 256–269 (2016).
471. Frid, M. G., Thurman, J. M., Hansen, K. C., Maron, B. A. & Stenmark, K. R. Inflammation, immunity, and vascular remodeling in pulmonary hypertension; Evidence for complement involvement? *Glob Cardiol Sci Pract* **2020**, e202001.
472. Wang, R. *et al.* Immunity and inflammation in pulmonary arterial hypertension: From pathophysiology mechanisms to treatment perspective. *Pharmacological Research* **180**, 106238 (2022).
473. Le rôle des lymphocytes T régulateurs dans l’hypertension artérielle pulmonaire. <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/JAHA.119.014201>
doi:10.1161/JAHA.119.014201.
474. Kherbeck, N. *et al.* The Role of Inflammation and Autoimmunity in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinic Rev Allerg Immunol* **44**, 31–38 (2013).
475. Breitling, S. *et al.* The mast cell–B cell axis in lung vascular remodeling and pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **312**, L710–L721 (2017).
476. Safety and Efficacy of B-Cell Depletion with Rituximab for the Treatment of Systemic Sclerosis–associated Pulmonary Arterial Hypertension: A Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-controlled Trial | American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.202009-3481OC>.
477. Nagai, H. *et al.* Pulmonary Macrophages Attenuate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction via β 3AR/iNOS Pathway in Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *PLOS ONE* **10**, e0131923 (2015).

478. Carragher, D. M., Rangel-Moreno, J. & Randall, T. D. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Seminars in Immunology* **20**, 26–42 (2008).
479. Perros, F. *et al.* Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **185**, 311–321 (2012).
480. Nicolls, M. R., Taraseviciene-Stewart, L., Rai, P. R., Badesch, D. B. & Voelkel, N. F. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *European Respiratory Journal* **26**, 1110–1118 (2005).
481. Colvin, K. L., Cripe, P. J., Ivy, D. D., Stenmark, K. R. & Yeager, M. E. Bronchus-associated Lymphoid Tissue in Pulmonary Hypertension Produces Pathologic Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 1126–1136 (2013).
482. Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M. & Kim, C. H. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* **145**, 396-406.e1–10 (2013).
483. Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice. *Gastroenterology* **145**, 396-406.e10 (2013).
484. R Muralitharan, R. & Marques, F. Z. Diet-related gut microbial metabolites and sensing in hypertension. *J Hum Hypertens* **35**, 162–169 (2021).
485. Cantoni, S. *et al.* Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration in pulmonary artery smooth muscle cells through Akt inhibition. *FEBS J* **280**, 2042–2055 (2013).
486. Comalada, M. *et al.* The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**, 487–497 (2006).
487. Salvi, P. S. & Cowles, R. A. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells* **10**, 1775 (2021).

488. Milo, L. A., Reardon, K. A. & Tappenden, K. A. Effects of Short-Chain Fatty Acid-Supplemented Total Parenteral Nutrition on Intestinal Pro-Inflammatory Cytokine Abundance. *Dig Dis Sci* **47**, 2049–2055 (2002).
489. Bartolomaeus, H. *et al.* Blood pressure changes correlate with short-chain fatty acid production potential shifts under a synbiotic intervention. *Cardiovasc Res* **116**, 1252–1253 (2020).
490. Karoor, V. *et al.* The Short-Chain Fatty Acid Butyrate Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling and Inflammation in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci* **22**, 9916 (2021).
491. Koyama, M. *et al.* Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **306**, H1314–H1323 (2014).
492. Wu, Y. *et al.* 4-Phenylbutyric Acid Induces Protection against Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *PLoS One* **11**, e0157538 (2016).
493. Sharma, R. K. *et al.* Pulmonary arterial hypertension-associated changes in gut pathology and microbiota. *ERJ Open Res* **6**, 00253–02019 (2020).
494. Zhang, L. *et al.* Sodium butyrate attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by inhibiting COX2/PGE2 pathway via a HDAC5/HDAC6-dependent mechanism. *J Cell Mol Med* **23**, 8139–8150 (2019).
495. Colla, E. Linking the Endoplasmic Reticulum to Parkinson's Disease and Alpha-Synucleinopathy. *Front Neurosci* **13**, 560 (2019).
496. Kushwaha, V. *et al.* Sodium butyrate reduces endoplasmic reticulum stress by modulating CHOP and empowers favorable anti-inflammatory adipose tissue immune-metabolism in HFD fed mice model of obesity. *Food Chem (Oxf)* **4**, 100079 (2022).

497. Postma, D. S. & Timens, W. Remodeling in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 434–439 (2006).
498. Huang, J., Olivenstein, R., Taha, R., Hamid, Q. & Ludwig, M. Enhanced Proteoglycan Deposition in the Airway Wall of Atopic Asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 725–729 (1999).
499. Giannandrea, M. & Parks, W. C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models & Mechanisms* **7**, 193–203 (2014).
500. Ventura, I. *et al.* Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy* **69**, 898–905 (2014).
501. Arvidsson, M., Ahmed, A., Säleby, J., Hesselstrand, R. & Rådegran, G. Plasma matrix metalloproteinase 2 is associated with severity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. circ.* **12**, (2022).
502. Islam, R., Dash, D. & Singh, R. Intranasal curcumin and sodium butyrate modulates airway inflammation and fibrosis via HDAC inhibition in allergic asthma. *Cytokine* **149**, 155720 (2022).
503. Meyer, M. & Jaspers, I. Respiratory protease/antiprotease balance determines susceptibility to viral infection and can be modified by nutritional antioxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **308**, L1189–L1201 (2015).
504. Kersul, A. L. *et al.* Molecular mechanisms of inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* **47**, 176–183 (2011).
505. Nugteren, S. & Samsom, J. N. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) in mucosal tissues: Protects against inflammation, but promotes cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **59**, 22–35 (2021).
506. Yao, G. *et al.* CUX2 prevents the malignant progression of gliomas by enhancing ADCY1 transcription. *Exp Brain Res* **240**, 3153–3165 (2022).

507. Sun, Y. *et al.* CUX2 functions as an oncogene in papillary thyroid cancer. *Oncotargets Ther* **12**, 217–224 (2019).
508. Li, L. *et al.* CUX2/KDM5B/SOX17 Axis Affects the Occurrence and Development of Breast Cancer. *Endocrinology* **163**, bqac110 (2022).
509. Takabe, P. *et al.* Hyaluronan synthase 3 (HAS3) overexpression downregulates MV3 melanoma cell proliferation, migration and adhesion. *Experimental Cell Research* **337**, 1–15 (2015).
510. Kong, X. *et al.* Over-Expression of GUSB Leads to Primary Resistance of Anti-PD1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Front Immunol* **13**, 876048 (2022).
511. Bhatt, A. P. *et al.* Targeted inhibition of gut bacterial β -glucuronidase activity enhances anticancer drug efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 7374–7381 (2020).
512. Zhang, C. *et al.* Altered Airway Microbiota Composition in Patients With Pulmonary Hypertension. *Hypertension* **76**, 1589–1599 (2020).
513. Zhu, W., Wu, Y., Liu, H., Jiang, C. & Huo, L. Gut-Lung Axis: Microbial Crosstalk in Pediatric Respiratory Tract Infections. *Front Immunol* **12**, 741233 (2021).
514. Sencio, V., Machado, M. G. & Trottein, F. The lung-gut axis during viral respiratory infections: the impact of gut dysbiosis on secondary disease outcomes. *Mucosal Immunol* **14**, 296–304 (2021).
515. Li, G. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 activation ameliorates pulmonary endothelial dysfunction in rats with pulmonary arterial hypertension through mediating phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of the American Society of Hypertension* **11**, 842–852 (2017).
516. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).

517. Schirmer, M., Garner, A., Vlamakis, H. & Xavier, R. J. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol* **17**, 497–511 (2019).
518. Walters, W. A., Xu, Z. & Knight, R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters* **588**, 4223–4233 (2014).
519. Is inflammaging influenced by the microbiota in the aged gut? A systematic review. *Experimental Gerontology* **141**, 111079 (2020).
520. Kim, S. *et al.* Altered Gut Microbiome Profile in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension* **75**, 1063–1071 (2020).
521. Kummel, M. *et al.* Gut Microbiota Signature in Heart Failure Defined From Profiling of 2 Independent Cohorts. *Journal of the American College of Cardiology* **71**, 1184–1186 (2018).
522. Chen, R. *et al.* Puerariae Lobatae Radix with chuanxiong Rhizoma for treatment of cerebral ischemic stroke by remodeling gut microbiota to regulate the brain-gut barriers. *J Nutr Biochem* **65**, 101–114 (2019).
523. Zhang, J. *et al.* Beneficial effect of butyrate-producing Lachnospiraceae on stress-induced visceral hypersensitivity in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **34**, 1368–1376 (2019).
524. Vacca, M. *et al.* The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* **8**, 573 (2020).
525. Lippert, K. *et al.* Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Benef Microbes* **8**, 545–556 (2017).
526. Chávez-Carbajal, A. *et al.* Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 438 (2019).
527. Shen, F. *et al.* Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* **16**, 375–381 (2017).

528. Angelis, M. D. *et al.* Microbiota and Metabolome Associated with Immunoglobulin A Nephropathy (IgAN). *PLOS ONE* **9**, e99006 (2014).
529. Zhi, X.-Y., Jiang, Z., Yang, L.-L. & Huang, Y. The underlying mechanisms of genetic innovation and speciation in the family Corynebacteriaceae: A phylogenomics approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **107**, 246–255 (2017).
530. Ridaura, V. K. *et al.* Contextual control of skin immunity and inflammation by *Corynebacterium*. *J Exp Med* **215**, 785–799 (2018).
531. Hong, W. *et al.* Changes in the gut microbiome and metabolome in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Bioengineered* **12**, 5173–5183 (2021).
532. Hong, C.-J., Chen, S.-Y., Hsu, Y.-H. & Yen, G.-C. Protective effect of fermented okara on the regulation of inflammation, the gut microbiota, and SCFAs production in rats with TNBS-induced colitis. *Food Res Int* **157**, 111390 (2022).

Titre : Rôle du microbiote pulmonaire dans le remodelage vasculaire pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire : nouvel outil et cible biothérapeutique

Mots clés : Hypertension artérielle pulmonaire, microbiote pulmonaire, remodelage vasculaire, métabolite bactérien, architecture pulmonaire, innovation thérapeutique

Résumé : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare et chronique, due à une occlusion progressive des artères pulmonaires distales, avec pour conséquence une augmentation de la résistance vasculaire et de la pression artérielle pulmonaire moyenne, entraînant *in fine* une insuffisance cardiaque droite et la mort. Les techniques de séquençage à haut débit et les outils bio-informatiques ont permis de montrer que le poumon n'est pas un organe stérile comme cela était pensé, mais qu'il serait colonisé par des microorganismes, notamment des bactéries. Des études ont permis d'associer des profils de communautés bactériennes à diverses pathologies respiratoires. Nous avons émis l'hypothèse que certains métabolites du microbiote pulmonaire pourraient influencer le développement de l'HTAP. Nous avons montré que les récepteurs des acides gras à chaîne courte (AGCC) sont dérégulés dans l'HTAP. Le butyrate, un AGCC, inhibe la prolifération, la migration et l'inflammation, *in vitro*, dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires. Dans le modèle d'hypertension pulmonaire (HTP) induite par la monocrotaline (MCT),

le butyrate améliore les paramètres hémodynamiques et le remodelage vasculaire. Une approche RNAseq a permis d'identifier les cibles du butyrate et de mieux comprendre son mode d'action. Nous avons montré également que le profil des communautés bactériennes était modifié dans l'HTP expérimentale aussi bien dans l'intestin que dans le poumon. Enfin, dans un modèle de rat axénique, nous avons observé en post-natal, une diminution du nombre des alvéoles et une musculation des artéoles associées à des infiltrats de cellules lymphoïdes et myéloïdes proliférantes dans les parois bronchiques, alvéolaires et vasculaires, suggérant que l'absence de microbiote influence le développement de l'arbre vasculaire pulmonaire et de la structure alvéolaire. Ces résultats apportent de nouveaux éléments pour étayer le lien entre le microbiote et l'HTAP et pourraient contribuer à l'identification de nouveaux marqueurs bactériens pour améliorer le diagnostic par le dosage de métabolites bactériens circulants et les solutions thérapeutiques ciblées dans l'HTAP, prenant en compte l'écosystème bactérien.

Title: Role of pulmonary microbiota in pulmonary vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension: a new tool and biotherapeutic target

Keywords: Pulmonary arterial hypertension, pulmonary microbiota, vascular remodeling, bacterial metabolite, pulmonary architecture, therapeutic innovation

Abstract: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and chronic disease, caused by progressive occlusion of the distal pulmonary arteries, resulting in increased vascular resistance and mean pulmonary arterial pressure, ultimately leading to right heart failure and death. High-throughput sequencing techniques and bioinformatics tools have made it possible to show that the lung is not a sterile organ as previously thought, but that it is colonised by microorganisms, particularly bacteria. Studies have made it possible to associate bacterial community profiles with various respiratory pathologies. We hypothesised that certain metabolites in the lung microbiota could influence the development of PAH. We have shown that short-chain fatty acid (SCFA) receptors are deregulated in PAH. Butyrate, a SCFA, inhibits proliferation, migration and inflammation in pulmonary artery smooth muscle cells *in vitro*. In the monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH) model, butyrate improves

hemodynamic parameters and vascular remodelling. An RNAseq approach allowed us to identify the targets of butyrate and to better understand its mode of action. We also showed that the profile of bacterial communities was modified in experimental PH in both the intestine and the lung. Finally, in an axenic rat model, we observed postnatal reduction in the number of alveoli and muscularisation of arterioles associated with infiltrates of proliferating lymphoid and myeloid cells in the bronchial, alveolar and vascular walls, suggesting that the absence of microbiota influences the development of the pulmonary vascular tree and alveolar structure. These results provide new evidence to support the link between microbiota and PAH and may contribute to the identification of new bacterial markers to improve diagnosis by measuring circulating bacterial metabolites and targeted therapeutic solutions in PAH, taking into account the bacterial ecosystem.